



**Embalagem Alimentar Ativa à base de Proteína de Soro de Leite  
com Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas:  
Desenvolvimento, Segurança e Eficácia**

Mariana Alvoco Andrade

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Doutora Ana Sanches Silva  
Professora Doutora Deodália Dias

O presente trabalho de investigação insere-se no projeto “Rose4Pack: Embalagem biodegradável ativa com extrato de alecrim para incrementar a vida útil dos alimentos”, financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE (FCOMP-01-0124-FEDER-028015) e por Fundos nacionais da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AGR-TEC/3366/2012), coordenado pela Doutora Ana Sanches Silva e, no projeto “Desenvolvimento de um filme comestível à base de proteína do soro de leite com atividade antioxidante e antimicrobiana utilizando óleos essenciais” (2012DAN807), financiado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Lisboa, Portugal).

As referências bibliográficas apresentadas nesta dissertação encontram-se de acordo com as *guidelines* da revista *Journal of Food Science and Technology*.

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da autora.

Com a exceção das indicadas, todas as figuras, esquemas, gráficos e tabelas presentes neste trabalho são da autoria da autora.



**UNIÃO EUROPEIA**

**Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional**



*Aos meus pais,  
Aos meus padrinhos  
E ao Guilherme.*

*Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on  
the light.*

J. K. Rowling

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Ana Sanches Silva por todos os ensinamentos, todo o apoio, dedicação e compreensão demonstrados durante este trabalho e a oportunidade e o voto de confiança dados. Agradeço também a preocupação e amizade demonstrados ao longo deste ano.

Agradeço também à Doutora Helena Soares Costa pelo bom acolhimento na Unidade de Investigação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

Agradeço à Dra. Maria Antónia Calhau por ter aceitado o meu trabalho e por me ter recebido tão amavelmente, no Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do INSA.

À Professora Doutora Deodália Dias por todo o apoio demonstrado nestes dois últimos anos e na realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Margarida Saraiva por me acolher a mim e às minhas ideias tão atenciosamente no DAN do INSA do Porto, e por todo o apoio demonstrado ao longo deste trabalho.

Agradeço também à Dra. Conceição Costa Bonito pelos ensinamentos, por me ter acompanhado no laboratório e por me ter recebido tão calorosamente.

Agradeço a todas as colegas do Departamento de Alimentação e Nutrição do Porto por toda a amizade e disponibilidade demonstrada na minha curta estadia.

Agradeço à Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril por todos os ensinamentos e pela colaboração nesta tese.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup>. Doutora Manuela Guerra, pelo interesse demonstrado no meu projeto e por todo o apoio e disponibilidade demonstrados para a realização da análise sensorial. Gostaria também de deixar uma nota de agradecimento à Prof<sup>ª</sup>. Cláudia Azevedo

por todo o apoio dado na licenciatura e por ter permitido o contato para a realização da análise sensorial.

Agradeço também a todo o painel de provadores presente na análise sensorial.

Agradeço também os ensinamentos e acompanhamento no laboratório de microbiologia da Mestre Carla Maia.

Agradeço todo o apoio na parte de microbiologia à Eng<sup>a</sup>. Cristina Belo.

Gostaria também de deixar uma nota de agradecimento a todos os trabalhadores do DAN do INSA de Lisboa que me receberam e apoiaram durante todo este ano.

Deixo um agradecimento especial à Regiane, por tudo. Todo o apoio, amizade, carinho. Por todos os ensinamentos, pela companhia nas longas horas, pelos almoços, risadas, pela boa disposição e por toda a amizade e companheirismo. Mesmo longe, estiveste sempre presente.

Agradeço à Mafalda Silva pela boa companhia e disposição, amizade e ensinamentos matemáticos. Agradeço também à Maria Inês Santos a boa companhia e disposição, amizade e pelas horas de almoço a fugir das ditas. Desculpa Mafalda!

À Vera por estar desde sempre comigo, em tudo, por toda a amizade incondicional.

À Sara “Zaza” e Catarina Santana por todas as maluqueiras e amizade ao longo de todos estes anos. À Marta por toda a amizade, compreensão e apoio. Ao Pedro e à Joana “Joaninha”, mesmo a milhares de quilómetros, agradeço toda a amizade. À Beatriz Pereira, Gonçalo Henriques, Rafael Pereira, António “TóBé” por toda a amizade. Ao Bruno pela amizade nestes dois anos de mestrado.

À Ana e Luís e tios Armandina e Carlos pela grande hospitalidade e por me acolherem nas muitas idas ao Porto. Às minhas primas Joana, Inês e Bea por toda a amizade. A toda a minha família pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus padrinhos, Doroteia e António, por todo o apoio, amor e compreensão durante toda a minha vida e em especial nestes dois últimos anos tão difíceis.

Aos meus avós.

Ao Guilherme por todo o amor, amizade e compreensão. Pelo apoio, pelas nerdices e gordices, por estar sempre ao meu lado e nunca me faltar.

E por fim, aos meus pais por tudo o que fizeram por mim, por me fazerem chegar até aqui. À minha mãe que nunca baixou os braços e ao meu pai pelo carinho e amor sem limites.

## Resumo

---

Concebidas para transpor as limitações das embalagens tradicionais, as embalagens ativas oferecem uma proteção adicional ao alimento em relação aos vários fatores que o podem afetar. As embalagens ativas podem ser agrupadas em embalagens absorvedoras e embalagens libertadoras ou emissoras. As embalagens libertadoras ou emissoras são embalagens que libertam compostos ativos, de forma controlada, para que estes possam interagir com os alimentos embalados. Estas embalagens, podem retardar ou mesmo inibir processos de deterioração dos alimentos, tais como a oxidação lipídica, ou o crescimento de microrganismos patogénicos, permitindo aumentar o tempo de vida útil dos alimentos.

Na sua grande maioria, as embalagens tradicionais, são fabricadas a partir de materiais não biodegradáveis que, para além de representarem um grave problema ambiental, podem interagir de forma não intencional com a matriz alimentar que protegem, passando para os alimentos compostos potencialmente tóxicos para a Saúde Humana. Este fenómeno de transferência de massa é denominado migração. Quando aplicado às embalagens ativas trata-se de um processo desejado, já que se trata de substâncias destinadas a prolongar a vida útil do alimento.

As propriedades biológicas das plantas aromáticas são conhecidas desde a antiguidade e utilizadas em diversas áreas, como a culinária, a medicina e a cosmética. A aplicação de extratos e óleos essenciais de plantas aromáticas como aditivos alimentares tem sido muito estudada pela comunidade científica e testada pela indústria alimentar. De facto, alguns deles já se encontram autorizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Comissão Europeia (CE).

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma embalagem ativa edível, à base de proteína de soro de leite incorporada com extratos de plantas aromáticas, de modo a retardar ou mesmo inibir a oxidação lipídica de alimentos com alto teor lipídico.

No âmbito deste trabalho foi também estudada a capacidade antimicrobiana da embalagem ativa e realizada uma análise sensorial para avaliação do efeito da embalagem num alimento modelo e sua potencial aceitação comercial.

Inicialmente foi comparada a capacidade antioxidante de extratos de duas plantas aromáticas (alecrim e tomilho), provenientes de três marcas comerciais, e das suas combinações através de dois métodos (sistema de inibição do radical livre DPPH e teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno). O extrato escolhido para ser incorporado no filme à base de proteína de soro de leite foi o extrato etanólico de alecrim da marca C. Esta escolha foi baseada não só nos resultados obtidos pelos dois ensaios de capacidade antioxidante utilizados, mas também com base na menor toxicidade do solvente de extração.

Os três extratos de alecrim foram posteriormente estudados quanto à sua composição em ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol, tendo o extrato da proveniente da marca comercial C mostrado o maior conteúdo da soma de ácido carnósico e carnosol. Relativamente à capacidade antimicrobiana, o extrato escolhido demonstrou ter a capacidade antimicrobiana contra os microrganismos *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *C. perfringens*.

Posteriormente foi otimizado o processo de elaboração do filme ativo à base de proteína de soro de leite. Foram testadas diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e de extrato ativo. O alimento modelo escolhido para ser embalado com a embalagem ativa foi o salame por apresentar um alto teor lipídico. As fatias de salame foram embaladas com o filme ativo e um filme controlo (sem extrato) durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias, à temperatura de 5 °C, protegidas da luz. O estado de oxidação lipídica deste foi avaliada através de quatro métodos: o índice de peróxidos, o valor da *p*-anisidina, o teste de TBARS e o ensaio do hexanal. Para todos os ensaios, com exceção do ensaio da *p*-anisidina, verifica-se que o filme ativo tende a proteger o alimento da oxidação lipídica em relação ao filme controlo (sem extrato ativo). Os resultados do valor de *p*-anisidina foram inconclusivos.

No que diz respeito à avaliação da capacidade antimicrobiana, a embalagem ativa inibiu as estripes analisadas, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Na análise sensorial realizada, o painel de provadores definiu as fatias de salame embaladas com a embalagem ativa como ligeiramente amargas, de aspeto apelativo, macias e suculentas. A apreciação geral do painel foi positiva.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a embalagem à base de proteína de soro de leite com extrato de alecrim tende a inibir a oxidação lipídica do salame e inibe o crescimento dos microrganismos *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Outros estudos são necessários para melhorar a incorporação do extrato de alecrim na embalagem à base de proteína de soro de leite e para testar a eficácia frente à oxidação lipídica durante períodos de armazenamento mais longos e em relação a outros alimentos com alto teor lipídico.

**Palavras-chave:** Alecrim; Embalagem ativa; Extratos de plantas aromáticas; Oxidação lipídica; Proteína de soro de leite; Tomilho.

---



## Abstract

---

Designed to overcome the limitations of traditional packaging, active packaging offers additional protection from the various factors that might affect food. Active packaging can be divided into absorbing/scavenging packaging and releasing packaging. The releasing packaging allows controlled release of active compounds that can interact with the packaged food. These packages may delay or inhibit the deterioration processes of foods such as lipid oxidation, or the growth of pathogenic microorganisms, allowing to extend food shelf life.

In its vast majority, traditional packages are manufactured from non-biodegradable materials which, in addition to represent a serious environmental concern, they may interact unintentionally with the food matrix they protect, passing potentially toxic compounds to Human health. This mass transfer phenomenon is called migration. When applied to the active packaging it is a desired process, since the substances are intended to extend food shelf life.

The biological properties of aromatic plants are known since ancient times and are used in various fields such as cookery, medicine and cosmetics. The application of extracts and essential oils from aromatic plants as food additives has been studied by the scientific community and tested by food industry. In fact, some have already been authorized by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Commission (EC).

The main aim of this work was the development of an edible active packaging, whey protein-based incorporated with aromatic plants extracts, to delay or even inhibit lipid oxidation of foods with high lipid content.

In this work it was also studied the antimicrobial capacity of the active packaging and a sensory analysis was carried to evaluation the effect of packaging in a food model and its potential commercial acceptance.

Initially the antioxidant capacity of two aromatic plant extracts (rosemary and thyme), from three brands and their combinations was compared by two methods (free radical DPPH inhibition system and the  $\beta$ -carotene bleaching test). The extract selected to be incorporated in the whey protein based film was the ethanolic rosemary extract from the C brand. This choice was based not only on the results obtained by the two antioxidant capacity assays but also on the lower toxicity of the extraction solvent.

The three rosemary extracts were subsequently studied regarding their composition in rosmarinic acid, carnosic acid and carnosol. The extract from the C brand showed the highest content of the sum of carnosic acid and carnosol. Regarding the antimicrobial capacity, the chosen extract demonstrated antimicrobial properties against the microorganisms *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *C. perfringens*. Afterwards the process to produce the active film based on whey protein was optimized. Different concentrations of plasticizer (glycerol) and active extract were tested.

The model food chosen to be packaged with the active film was salami which presents a high lipid content. Slices of salami were packaged with the active film and the control film (without extract) for 7, 15, 30, 60 and 90 days at a temperature of 5 °C, protected from light. The lipid oxidation status of the salami slices was evaluated by four methods: peroxide value, p-anisidine value, TBARS test and hexanal assay. All tests, with the exception of the p-anisidine test, indicate the active film tends to protect salami slices against lipid oxidation when compared to the control film. The results of p-anisidine value were inconclusive.

Regarding the antimicrobial capacity, the active film inhibited the strains, *L. monocytogenes* and *S. aureus*. In the sensorial analysis, the sensory panel defined the salami slices packaged with the active film as slightly bitter, appealing, soft and juicy. The overall assessment of the panel was positive.

The results of this study indicate the new active whey protein packaging with the rosemary extract tends to inhibit lipid oxidation of salami and inhibits the growth of the

microorganisms *L. monocytogenes* and *S. aureus*. Further studies are required to improve the incorporation of rosemary extract in the whey protein based packaging and to test its effectiveness against the lipid oxidation during longer periods of storage and over other high fatty foods.

**Keywords:** Active packaging; Aromatic plants extracts; Lipid oxidation; Rosemary; Thyme; Whey protein.

---

# Índice

<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Oxidação Lipídica .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Métodos para a avaliação do estado oxidativo da gordura .....	3
1.1.1.1. Índice de Peróxidos .....	3
1.1.1.2. Valor de <i>p</i> -anisidina .....	4
1.1.1.3. Ensaio de TBARS.....	4
1.1.1.4. Determinação do Hexanal .....	5
<b>1.2. Salame.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Embalagens Alimentares.....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Migração .....	7
1.3.2. Embalagens Alimentares Ativas .....	9
1.3.3. Embalagens Alimentares Inteligentes .....	10
<b>1.4. Proteína de Soro de Leite.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Plantas Aromáticas.....</b>	<b>12</b>
1.5.1. Óleos Essenciais .....	13
1.5.2. Extratos de Plantas Aromáticas.....	14
1.5.3. Compostos Fenólicos.....	15
1.5.4. Propriedades Biológicas .....	17
1.5.4.1. Capacidade Antioxidante .....	17
1.5.4.1.1. Métodos para determinar a capacidade antioxidante.....	19
1.5.4.1.2. Sistema de inibição do radical livre DPPH.....	19

1.5.4.1.3. Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno .....	19
1.5.4.2. Capacidade Antimicrobiana .....	19
1.5.5. Alecrim .....	21
1.5.6. Tomilho .....	24
<b>1.6. Análise Sensorial.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Plantas Aromáticas.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Preparação dos Extratos de Plantas Aromáticas .....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Reagentes e Solventes.....	31
3.2.2. Equipamentos .....	31
3.2.3. Procedimento.....	31
<b>3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> dos Extratos de Plantas Aromáticas .....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Equipamentos .....	33
3.3.2. Reagentes e Solventes.....	33
3.3.3. Sistema de inibição do radical livre DPPH.....	33
3.3.4. Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno .....	34
<b>3.4. Seleção do extrato de plantas aromáticas a incorporar ao filme ativo.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Determinação e Quantificação dos Compostos Fenólicos.....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Reagentes, Solventes e Padrões .....	35
3.5.2. Equipamentos .....	35
3.5.3. Procedimento.....	36
3.5.4. Análise da Atividade Antimicrobiana do Extrato .....	37
<b>3.6. Desenvolvimento da Embalagem Ativa .....</b>	<b>37</b>
3.6.1. Reagentes e Solventes.....	37
3.6.2. Equipamentos .....	37
3.6.3. Procedimento.....	38
3.6.4. Análise da Atividade Antimicrobiana do Filme Ativo .....	40
<b>3.7. Estudo da eficácia do filme ativo no controlo da oxidação lipídica de um alimento modelo.....</b>	<b>41</b>
3.7.1. Amostras e Equipamentos .....	41
3.7.2. Procedimento.....	42
<b>3.8. Ensaios para determinar o estado da oxidação lipídica de um alimento modelo.....</b>	<b>42</b>

3.8.1. Amostras.....	43
3.8.2. Extração de Gordura.....	43
3.8.2.1. Reagentes, Solventes e Equipamentos .....	43
3.8.2.2. Procedimento.....	43
3.8.3. Índice de Peróxidos.....	44
3.8.3.1. Reagentes e Solventes .....	44
3.8.3.2. Equipamentos .....	44
3.8.3.3. Procedimento.....	44
3.8.4. Determinação do valor de <i>p</i> -anisidina .....	45
3.8.4.1. Reagentes e Solventes .....	45
3.8.4.2. Equipamentos.....	45
3.8.4.3. Procedimento.....	45
3.8.5. Ensaio de TBARS.....	46
3.8.5.1. Reagentes e Solventes .....	46
3.8.5.2. Equipamentos.....	46
3.8.5.3. Procedimento.....	46
3.8.6. Ensaio do Hexanal .....	47
3.8.6.1. Reagentes e Solventes .....	47
3.8.6.2. Equipamentos e Material .....	47
3.8.6.3. Procedimento.....	47
<b>3.9. Análise Sensorial.....</b>	<b>48</b>
<b>3.10. Análise Estatística.....</b>	<b>50</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Atividade Antioxidante .....</b>	<b>51</b>
4.1.1. Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> dos Extratos.....	51
<b>4.2. Quantificação de Compostos Fenólicos por UPLC-DAD em extratos de alecrim.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Capacidade Antimicrobiana do Extrato.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4. Desenvolvimento da Embalagem Ativa .....</b>	<b>59</b>
4.4.1. Efeito do Glicerol.....	59
4.4.2. Otimização da incorporação de Extrato.....	59
<b>4.5. Capacidade Antimicrobiana dos Filmes Ativos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.6. Estado de oxidação lipídica do alimento modelo embalado com filmes ativos.....</b>	<b>65</b>
4.6.1. Determinação do índice de peróxidos .....	65

4.6.2.	Determinação do valor de <i>p</i> -anisidina .....	67
4.6.3.	Teste de TBARS.....	69
4.6.4.	Determinação do hexanal.....	71
<b>4.7.</b>	<b>Análise Sensorial.....</b>	<b>73</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
	Anexo I – Questionário da Análise Sensorial .....	101
	Anexo II – Comunicações Internacionais/Nacionais sob a forma de <i>Poster</i> .....	107
	Anexo III – Comunicações Internacionais/Nacionais sob a forma de <i>Poster</i> -	
	<i>Abstracts</i> .....	108

## Índice de Figuras

Fig. 1.1. Esquema simplificado da oxidação lipídica .....	2
Fig. 1.2. Estrutura química representativa do malonaldeído (MDA). .....	4
Fig. 1.3. Estrutura química representativa do hexanal. ....	5
Fig. 1.4. Estrutura química do ácido rosmarínico .....	17
Fig. 1.5. Estrutura química do ácido carnósico (esquerda) e do carnosol (direita) .....	17
Fig. 1.6. Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	21
Fig. 1.7. Ramos de tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> L.) .....	24
Fig. 0.1. Folhas secas de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	30
Fig. 0.2. Procedimento de preparação do extrato de alecrim. ....	31
Fig. 0.3. Extrato de alecrim .....	32
Fig. 0.4. Procedimento de preparação do filme ativo. ....	38
Fig. 0.5. Processo de otimização do filme com 5 % (p/p), 8 % (p/p) e 15 % (p/p) de glicerol .....	39
Fig. 0.6. Processo de otimização do filme com 10 % (p/p) de glicerol. ....	39
Fig. 0.7. Filme ativo após evaporação do solvente .....	40
Fig. 0.8. Quadrados 5 x 5 cm do filme controlo (A) e do filme ativo (B). ....	41
Fig. 0.9. Fatias de salame embaladas com o filme controlo (A) e o filme ativo com 1 % (p/p) de extrato de alecrim (B) .....	42
Fig. 0.10. Extração da gordura do salame com éter de petróleo. ....	43
Fig. 0.11. Esquema do ensaio para a determinação do hexanal por UPLC®-DAD .....	48
Fig. 0.12. Apresentação das amostras ao painel de provadores da análise sensorial. ....	49
Fig. 3.1. Gráfico de comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH• (colunas) e do branqueamento do β-caroteno (triângulos). ....	52



Fig. 3.2. Comparação dos resultados dos ensaios do DPPH• (colunas) e do β-caroteno (triângulos) das misturas e dos extratos escolhidos .....	54
Fig. 3.3. Cromatograma dos padrões de ácido rosmarínico (1), carnosol (2) e ácido carnósico (3).....	55
Fig. 3.4. Conteúdo em ácido rosmarínico dos extratos obtidos a partir das 3 marcas comerciais de alecrim seco. ....	56
Fig. 3.5. Conteúdo em ácido carnósico e carnosol dos extratos etanólicos obtidos a partir das 3 marcas comerciais de alecrim seco. ....	57
Fig. 3.6. Resultados dos testes de inibição do extrato com 6 meses (a) e do extrato fresco (b). ....	58
Fig. 3.7. Otimização da incorporação do extrato no filme à base de proteína de soro de leite com 5% de glicerol (p/p).....	60
Fig. 3.8. Otimização da incorporação do extrato no filme à base de proteína de soro de leite com 10% de glicerol (p/p). ....	61
Fig. 3.9. Otimização da incorporação do extrato de alecrim diluído em etanol no filme à base de proteína de soro de leite com 10% de glicerol (p/p).. ....	62
Fig. 3.10. Otimização da incorporação do extrato de alecrim não diluído (3 e 5%, p/p) no filme à base de proteína de soro de leite com 8% de glicerol (p/p). ....	63
Fig. 3.11. Otimização da incorporação do extrato de alecrim (1 e 2%, p/p) no filme à base de proteína de soro de leite com 8% de glicerol (p/p).....	64
Fig. 3.12. Resultados do índice de peróxidos. ....	67
Fig. 3.13. Resultados do ensaio da <i>p</i> -anisidina.....	68
Fig. 3.14. Resultados do ensaio de TBARS.....	69
Fig. 3.15. Resultados do ensaio do hexanal.....	72
Fig. 3.16. Gráfico com as idades (à esquerda) e do nível de escolaridade (à direita) do painel. ....	74
Fig. 3.17. Gráfico em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras A, B, C e D .....	76
Fig. 3.18. Gráfico em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H .....	77
Fig. 3.19. Representação em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H .....	80
Fig. 3.20. Representação em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H .....	80

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Valor nutricional por 100 g de salame segundo a tabela de composição nutricional americana (USDA), tabela de composição portuguesa nacional (PT) e a tabela de composição nutricional japonesa (JP).....	6
Tabela 1.2. Principais proteínas presentes no soro de leite bovino. ....	11
Tabela 1.3. Composição nutricional do concentrado de proteína de soro de leite (WPC) e de isolado de proteína de soro de leite (WPI). ....	12
Tabela 1.4. Composição nutricional por 100 g de alecrim segundo as bases de dados de composição nutricional americana (USDA), italiana (IT) e espanhola (BEDCA). ....	22
Tabela 1.5. Compostos fenólicos determinados no alecrim, nos seus extratos e nos seus óleos essenciais. ....	23
Tabela 1.6. Composição nutricional por 100 gr de tomilho segundo as bases de dados de composição nutricional americana (USDA), francesa (ANSES), espanhola (BEDCA) e japonesa (JP).....	25
Tabela 1.7. Principais compostos fenólicos determinados no tomilho, nos seus extratos e nos seus óleos essenciais. ....	26
Tabela 0.1. Misturas efetuadas com os dois extratos individuais que apresentaram melhor capacidade antioxidante. ....	35
Tabela 0.2. Gradiente de eluição utilizado para análise cromatográfica do ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol.....	36
Tabela 0.3. Descritores selecionados para a avaliação descritiva das amostras. ....	49
Tabela 0.4. Decodificação das amostras em estudo. ....	50
Tabela 3.1. Contagens das placas de Petri inoculadas com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	64
Tabela 3.2. Contagens das placas de Petri inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> .....	65

Tabela 3.3. Código utilizado para melhor apresentação dos resultados. ....	74
Tabela 3.4. Valor $p$ das provas de análise sensorial de cada descritor e valor $p$ entra as provas.....	75
Tabela 3.5. Tabela com o valor médio de cada descritor da primeira prova.....	76
Tabela 3.6. Tabela com o valor médio de cada descritor da segunda prova.....	78
Tabela 3.7. Diferenças significativas entre as amostras na segunda prova.....	79

## Lista de Abreviaturas

AAC – Coeficiente da Atividade Antioxidante (do inglês *Antioxidant Activity Coefficient*)

ANSES - *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*

AOAC - *Association for Official Analytical Chemists*

AOCS – Sociedade Americana de Químicos de Óleos (do inglês *American Oil Chemists' Society*)

AV – Valor de *p*-anisidina (do inglês, *Anisidine Value*)

BEDCA – *Base de Datos Española de Composición de Alimentos*

BHA – Hidroxianisol butilado (do inglês, *Butylated Hydroxyanisole*)

BHI - *Brain Heart Infusion Broth*

BHT – Hidroxitolueno butilado (do inglês, *Butylated Hydroxytoluene*)

CE – Comissão Europeia

DAD – Detetor de Díodos (do inglês, *Diode Array Detection*)

2,4-DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ET – Equivalente Trolox

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

IP – Percentagem de Inibição (do inglês, *Inhibition Percentage*)

LME – Limite de Migração Específica

LMG – Limite de Migração Global

MDA – Malonaldeído

MS – Espectrômetro de Massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)

NMR – Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA - *Plate Count Agar*

PFBHA - *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo) cloridrato de hidroxilamina

PFE - Extração com Líquido Pressurizado (do inglês, *Pressurised Fluid Extration*)

PV – Índice de peróxidos (do inglês, *Peroxide Value*)

SCDLP - *Soybean Casein Lecithin Polysorbate*

TBA – Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acid*)

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TCA - Ácido Tricloroacético (do inglês, *Trichloroacetic acid*)

TEAC – Atividade Antioxidante Equivalente a Trolox (do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Activity*)

TSA - *Tryptone Soya agar*

UPLC® - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatograph*)

USDA - United States Department of Agriculture

USE - extração ultrassônica (*Ultrasonic Extraction*)

UV – Ultravioleta

WHO – World Health Organization

WPC – Concentrado de Proteína de Soro de Leite (do inglês, *Whey Protein Concentrate*)

WPI – Isolado de Proteína de Soro de Leite (do inglês, *Whey Protein Isolate*)

## Introdução

### 1.1. Oxidação Lipídica

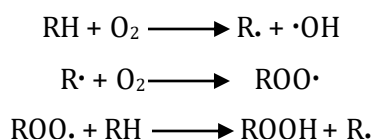
Os lípidos, além de contribuírem para o valor nutricional dos alimentos, são essenciais para uma dieta saudável e concedem aos alimentos características como a textura, suavidade, odor e sabor, importantes para os consumidores (Gutiérrez 2000; Márquez-Ruiz, *et al.* 2008). Os alimentos com alto teor lipídico são altamente suscetíveis à oxidação, especialmente quando conservados na presença de luz, oxigénio, humidade e a temperaturas elevadas (McClements e Decker 2000).

Sendo uma das maiores causas da deterioração da qualidade de géneros alimentícios, a oxidação lipídica pode representar um enorme prejuízo económico para a indústria alimentar. A nível molecular, a oxidação lipídica causa mudanças no tipo e na concentração dos componentes dos alimentos resultando na alteração das propriedades organoléticas dos mesmos, levando à formação de sabores e/ou odores desagradáveis, contribuindo para a alteração do seu valor nutricional e para a redução do tempo de vida útil. A oxidação lipídica representa também um perigo para a Saúde Pública uma vez que os subprodutos tóxicos resultantes deste processo, podem provocar o envelhecimento celular, carcinogénese, aterosclerose, mutagénese, doenças neurodegenerativas (tais como doença de Alzheimer e a doença de Parkinson) e doenças inflamatórias crónicas (Gutiérrez 2000; McClements e Decker 2000; Chanwitheesuk *et al.* 2005; Márquez-Ruiz, *et al.* 2008).

A oxidação lipídica (Fig. 1.1) é um processo sequencial químico em que os ácidos gordos insaturados, principais substratos destas reações, no seu estado livre, interagem com o oxigénio presente no ar. Ao mesmo tempo, este tipo de alteração pode ocorrer sobre outros substratos lipídicos não saturados como o esqualeno (um hidrocarboneto que se

encontra presente em óleos de pescado, no azeite, entre outros), os carotenoides e os tocoferóis. Esta reação química divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. Durante estes processos, ocorre uma série de reações complexas simultâneas e sequenciais (Ferrari 1998; Gutiérrez 2000; Frankel 2005).

Na primeira fase, as reações de iniciação podem ser promovidas pelo impacto ou absorção de energia e/ou por reações *redox*. O impacto ou a absorção de energia refere-se a momentos em que os alimentos podem estar sujeitos a fontes de elevada energia ou radiação ionizante, como por exemplo a radiação ultravioleta (UV) para efeitos de sanitização ou a micro-ondas. As reações *redox* são catalisadas por enzimas ou por metais de transição (reações de Haber-Weiss<sup>1</sup> e reações Fenton<sup>2</sup>). Estas reações são capazes de romper a barreira eletroquímica entre o oxigénio e as moléculas dos ácidos gordos insaturados (RH). Na fase de iniciação ocorre a interação de um iniciador com o oxigénio que, quando ativado, reage com o ácido gordo insaturado. Isto resulta na perda de um átomo de hidrogénio, que por sua vez resulta na formação de radicais aquilo (R•). Quando iniciada, a reação só termina quando todas as reservas de ácidos gordos insaturados e de oxigénio estiverem esgotadas (Logani e Davies 1980; Frankel 1980; Frankel 1996; Ferrari 1998; O'Connor e O'Brien 2006).



**Fig. 1.1.** Esquema simplificado da oxidação lipídica. RH representa um ácido gordo com um hidrogénio (Adaptado de Logani e Davies 1980).

A segunda fase, propagação, consiste num conjunto de reações que levam à formação de diversos hidroperóxidos (ROOH). Primeiro, o radical do ácido gordo insaturado reage com o oxigénio, formando rapidamente um radical peróxido (ROO•). Este radical peróxido pode reagir com outro ácido gordo insaturado formando outro radical aquilo e um hidroperóxido (Logani e Davies 1980; Frankel 1996; Ferrari 1998).

Na terceira e última fase, depois do esgotamento dos substratos, inicia-se a formação dos produtos finais. Ocorre a formação de produtos finais estáveis não reativos (Logani e Davies 1980; Ferrari 1998).

---

<sup>1</sup> A reação de Harber-Weiss gera radicais hidroxilo a partir de uma reação de ferro (III) com peróxidos de hidrogénio e superóxidos, catalisada pelo ferro.

<sup>2</sup> A reação de Fenton é o segundo passo da reação de Haber-Weiss, na qual ferro (II) reage com peróxido de oxigénio.

A fim de retardar ou inibir a oxidação lipídica, a indústria alimentar recorre a compostos com capacidade antioxidante. Estes compostos podem ser de origem natural ou sintética e podem ser adicionados ao produto alimentar ou incorporados na embalagem do produto.

### **1.1.1. Métodos para a avaliação do estado oxidativo da gordura**

Para a avaliação do estado oxidativo da gordura do alimento utilizado com o intuito de avaliar a ação do filme ativo produzido para este trabalho, recorreram-se a quatro métodos: o índice de peróxidos, a determinação do valor de *p*-anisidina, o Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico e a determinação do hexanal.

#### **1.1.1.1. Índice de Peróxidos**

Os hidroperóxidos (ou peróxidos) resultam da oxidação primária de óleos e gorduras. Para avaliar o estado de oxidação da matéria gorda de uma determinada amostra, o Índice de Peróxidos (PV – do inglês, *Peroxide Value*) é muito utilizado. Este valor dá-nos a informação da quantidade de hidroperóxidos presente numa amostra (Gray 1978; Mehta *et al.* 2015).

O método mais utilizado para a determinação do teor de peróxidos numa amostra é por iodometria. Este método está aprovado pela AOAC (*Association for Official Analytical Chemists*) e é baseado na libertação de iodo através das reações *redox* entre os peróxidos (dissolvidos em soluções orgânicas) e o iodeto de potássio (numa solução excessivamente saturada). O iodo libertado é titulado com tiosulfato utilizando uma solução de amido como indicador. Este ensaio é de fácil aplicação e é adequado a várias matrizes alimentares mas, apresenta algumas desvantagens como a absorção do iodo pelas ligações insaturadas da matéria gorda da amostra, a libertação do iodo a partir da solução saturada de iodeto de potássio, o pH e temperatura da solução e a agitação a que a solução da amostra foi submetida (Gray 1978; Chen *et al.* 2016).

Apesar de fornecer um valor indicativo do estado oxidativo dos lípidos, a utilização deste valor para a determinação da oxidação lipídica é limitada aos estádios iniciais da oxidação uma vez que, os peróxidos, são vulneráveis a reações químicas posteriores. Este ensaio mede o total de peróxidos expressado em moles de oxigénio ativo por quantidade de amostra (meq O<sub>2</sub>/kg de amostra) (Gray 1978; Chen *et al.* 2016; Okpala *et al.* 2016).

A Norma Portuguesa para a determinação do Índice de Peróxidos é a NP 4211:1922.



### 1.1.1.2. Valor de *p*-anisidina

Este ensaio mede a quantidade de aldeídos gerados durante a decomposição dos peróxidos, numa determinada amostra de gordura ou óleo. Os aldeídos reagem com a *p*-anisidina, em meio ácido, produzindo compostos de cor amarelada (Shahidi e Zhong 2005; Shahidi e Wanasundara 2008). Este ensaio, apesar de ser mais sensível aos aldeídos insaturados do que aos saturados, é um indicador fiável da oxidação lipídica e da rancidez das gorduras animais e óleos vegetais (Shahidi e Zhong 2005).

A Norma Portuguesa para a determinação do valor da *p*-anisidina é a NP 1819:1984.

### 1.1.1.3. Ensaio de TBARS

O ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS – do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), baseia-se na medição espectrofotométrica de um complexo formado pela reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric acid*) e o malonaldeído (MDA). A reação dos dois compostos produz um composto de cor vermelha, medido a um certo comprimento de onda entre os 500 e 550 nm. O MDA é um composto orgânico e um dos principais produtos naturalmente formado durante a oxidação lipídica pela decomposição dos ácidos gordos polinsaturados em hidroperóxidos (Osawa *et al.* 2005). A quantidade desta substância num determinado alimento dá-nos a informação relativa ao estado da oxidação da gordura do mesmo (Miller 1998). É um dos métodos mais utilizados na avaliação do estado da oxidação lipídica nos alimentos, especialmente em produtos de origem animal, (Ross e Smith 2006). No entanto, têm sido apontadas algumas limitações relativas a este método. Uma destas desvantagens é o facto de existir formação de MDA por auto-oxidação das moléculas da amostra com as condições do método, devido à temperatura a que a amostra é submetida. Outra limitação prende-se com o facto de o MDA não ser o único composto alimentar relacionado com a oxidação lipídica que reage com o TBA, podendo levar a uma sobrestimação dos resultados (Oakes e Kraak 2003; Ross e Smith 2006).

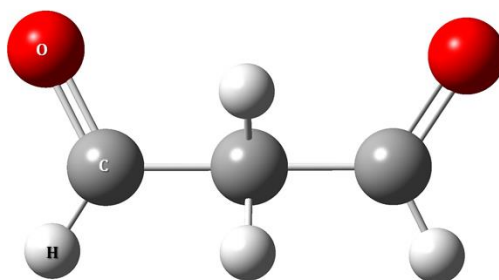
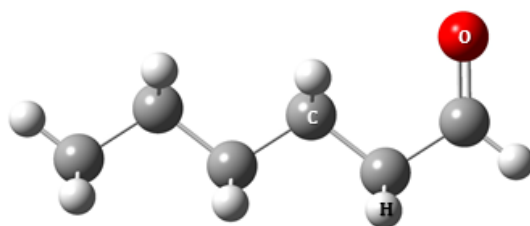


Fig. 1.2. Estrutura química representativa do malonaldeído (MDA).

#### 1.1.1.4. Determinação do Hexanal

Os aldeídos são os principais componentes voláteis da oxidação lipídica dos alimentos, pelo que são muito utilizados para medir o avanço da oxidação lipídica. O hexanal é um desses aldeídos, de baixo peso molecular, considerado indicador da oxidação lipídica uma vez ser o aldeído dominante formado no decurso da mesma. É formado através da oxidação do ácido linoleico pelo 13-hidroperóxido, induzida por radicais livres, e é considerado o melhor componente volátil para a medição da oxidação lipídica (Nissen *et al.* 2004; Sanches-Silva *et al.* 2004; Ross e Smith 2006). A presença deste aldeído também tem sido considerada como um possível bio marcador para o cancro do pulmão e relacionada com várias doenças tais como a aterosclerose, a displasia e o cancro (Xu *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014).



**Fig. 1.3.** Estrutura química representativa do hexanal.

A elevada concentração de aldeídos nas matrizes alimentares é responsável pela rancidez dos alimentos, representando uma das principais causas de perda da qualidade nutricional e organolética dos alimentos (Veloso *et al.* 2001). Devido à sua volatilidade, instabilidade, solubilidade em água e ao facto de carecerem de cromóforos e fluoróforos, a determinação de aldeídos é regra geral feita por cromatografia gasosa. No entanto, quando se pretende fazer a determinação por cromatografia líquida é necessário fazer uma derivatização<sup>3</sup>. No caso do hexanal, o agente de derivatização mais utilizado é a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), podendo-se também recorrer-se ao o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo) cloridrato de hidroxilamina (PFBHA) (Xu *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014).

---

<sup>3</sup> A derivatização é uma técnica utilizada para transformar uma substância em outra, através de uma reação química, com a mesma estrutura, mas diferentes propriedades. A substância derivada vai ter diferentes propriedades química como a solubilidade, os pontos de fusão e ebulição, entre outros, que vão facilitar a separação, deteção e quantificação de um determinado composto.

## 1.2. Salame

O salame é um produto de charcutaria, derivado da carne, com um alto teor lipídico. É de origem italiana e pode ser produzido através de carne de porco ou de vaca, vinho, sal e plantas aromáticas e especiarias. A composição nutricional do salame encontra-se representada na Tabela 1.1 (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology 2015; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2016; United States Department of Agriculture 2016).

**Tabela 1.1.** Valor nutricional por 100 g de salame segundo a tabela de composição nutricional americana (USDA), tabela de composição portuguesa nacional (PT) e a tabela de composição nutricional japonesa (JP).

	Unidade	Valor por 100 g		
		USDA	PT	JP
<b>Valor Energético</b>	kcal	425	422	497
<b>Macroconstituintes</b>				
<b>Água</b>	g	34,6	38	24,8
<b>Proteína</b>	g	21,7	19,5	25,4
<b>Lípidos</b>	g	37	37,6	43
<b>Hidratos de Carbono</b>	g	1,2	1,3	2,1
<b>Vitaminas</b>				
<b>Tiamina</b>	mg	0,93	0,36	0,10
<b>Riboflavina</b>	mg	0,33	0,22	0,31
<b>Niacina</b>	mg	5,6	6,6	4,7
<b>Vitamina B6</b>	mg	0,55	0,25	0,24
<b>Folatos</b>	µg	2	3	4
<b>Vitamina B12</b>	µg	2,8	1	1,6
<b>Minerais</b>				
<b>Cálcio (Ca)</b>	mg	10	25	14
<b>Ferro (Fe)</b>	mg	1,52	2,3	2,5
<b>Magnésio (Mg)</b>	mg	22	22	22
<b>Fosforo (P)</b>	mg	229	140	240
<b>Potássio (K)</b>	mg	340	140	370
<b>Sódio (Na)</b>	mg	1890	2300	1400
<b>Zinco (Zn)</b>	mg	4,2	4,3	4
<b>Lípidos</b>				
<b>Ácidos gordos saturados</b>	g	13,1	12,9	16
<b>Ácidos gordos monoinsaturados</b>	g	18,2	14,9	18,43
<b>Ácidos gordos polinsaturados</b>	g	3,6	4,3	4,59
<b>Colesterol</b>	mg	80	80	97

## 1.3. Embalagens Alimentares

O conceito moderno de embalagem alimentar surgiu no início do século XIX. Para responder às necessidades do exército francês durante as Guerras Napoleónicas, Nicolas Appert desenvolveu um método de conservação de alimentos através de frascos de vidro hermeticamente fechados. Esta descoberta impulsionou a invenção da lata de folha de flandres por Peter Durand. Com a I e II Guerras Mundiais, surgiram os primeiros materiais à base de petróleo, inicialmente utilizados para proteger munições e, depois adaptados para embalagens alimentares para acondicionarem cereais secos e biscoitos. Estes desenvolvimentos, grande parte impulsionados pelas necessidades dos exércitos, deram origem às embalagens que conhecemos hoje em dia feitas a partir de vários polímeros derivados do petróleo, como o polietileno (Coles *et al.* 2003; Brody *et al.* 2008).

A função principal da embalagem alimentar dita tradicional ou convencional é proteger os alimentos de fatores externos tais como as diferenças de temperatura, luz e microrganismos. Através da proteção em relação aos fatores externos, a degradação natural do alimento é retardada, as suas qualidades organoléticas e nutricionais são mantidas e o tempo de vida útil é aumentando bem como a segurança microbiológica dos alimentos. Estas embalagens pretendem também tornar o manuseamento dos produtos alimentares mais fácil, para além de informarem os consumidores sobre o valor nutricional e a composição dos alimentos (Brody *et al.* 2008; Dainelli *et al.* 2008).

As embalagens alimentares convencionais, de um modo geral, conseguem proteger os alimentos contra a sua degradação, mas são apenas barreiras desenhadas para retardar os efeitos adversos do meio contra o alimento que protegem (Brody *et al.* 2008).

As embalagens convencionais, uma vez que na sua grande maioria são feitas de materiais não biodegradáveis, representam também um problema ambiental, uma vez que a sua utilização produz resíduos alimentares e materiais (Thøgersen 1996). Para conseguir garantir a total segurança do consumo de alimentos embalados com embalagens convencionais, a interação entre o material da embalagem e o produto alimentar que esta protege, tem que ser mínimo, de maneira a que o produto não seja alterado nem sofra influencia do material pelo qual está embalado (Dainelli *et al.* 2008).

### 1.3.1. Migração

O Regulamento n.º10/2011 da Comissão Europeia (CE), relativo aos materiais e objetos de plástico destinados a entrar em contacto com géneros alimentícios, define que plásticos “compõem-se de monómeros e de outras substâncias iniciadoras que reagem

*quimicamente para formar uma estrutura macromolecular, o polímero, que constitui o principal componente estrutural dos plásticos. (...) O polímero enquanto tal é uma estrutura inerte de elevado peso molecular.” Estas substâncias, de peso molecular elevado, “não podem geralmente ser absorvidas pelo organismo, o potencial risco para a saúde decorrente do próprio polímero é mínimo”. O Regulamento adianta ainda que os riscos para a saúde advêm “dos monómeros ou das substâncias iniciadoras que não reagiram ou que reagiram incompletamente ou de aditivos de baixo peso molecular que são transferidos para os alimentos por migração a partir do material plástico em contacto com os alimentos” (Comissão Europeia 2011).*

A migração em alimentação está descrita na literatura como um processo de difusão que depende da matriz alimentar e do material de que é feita a embalagem. Esta interação pode alterar substancialmente as propriedades quer do alimento, quer da embalagem (Arvanitoyannis e Bosnea 2004; Sanches Silva *et al.* 2008). Partindo do princípio que a maioria das embalagens convencionais são feitas a partir de plásticos, este processo de difusão representa, não só um problema para a indústria alimentar, como também representa um problema de Saúde Pública gravíssimo, uma vez que as substâncias que poderão migrar das embalagens convencionais, podem ser tóxicas para o organismo humano. O Regulamento (CE) n.º10/2011 foi criado com o fim de estabelecer limites legais para a migração das embalagens para os alimentos. Este regulamento estabelece limites de migração para os materiais de origem plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos.

O limite de migração global (LMG) para as embalagens constituídas por materiais e objetos de matéria plástica é de 10 mg de substância por dm<sup>2</sup> de área superficial que está em contacto com o(s) alimento(s), o que corresponde a uma migração máxima de 60 mg/kg de alimento. O limite de migração específica (LME) consta da lista “positiva” do Anexo I do Regulamento (CE) n.º10/2011. No entanto, para algumas substâncias este limite ainda não está definido, aplicando-se apenas o LMG. O limite de migração máximo, para as substâncias que ainda não se encontram autorizadas através de uma barreira funcional é de 0,01 mg/kg. As substâncias que são consideradas tóxicas para a reprodução, cancerígenas ou mutagénicas não podem ser utilizadas nos materiais ou objetos que estão destinados a entrar em contacto com os alimentos, a menos que estejam previamente autorizadas. No caso das embalagens alimentares compostas a partir de plásticos e combinadas com outros materiais para os quais ainda não existem medidas específicas a nível da União Europeia, não se devem aplicar limites de migração específicos nem limites de migração global, com a exceção do cloreto de vinilo (Comissão Europeia 2011).

Segundo o mesmo regulamento, o limite de migração global representa o valor máximo permitido de substâncias não voláteis libertadas de um material ou objeto, destinado a entrar em contacto com alimentos, para os simuladores alimentares. O regulamento define um simulador alimentar como uma substância que apresenta as mesmas, ou, pelo menos, as principais propriedades físico-químicas de uma determinada matriz alimentar. Por sua vez, o limite de migração específica é o valor máximo permitido de uma determinada substância libertada a partir de um material ou objeto para os simuladores alimentares (Comissão Europeia 2011; Costa 2013).

Nas últimas décadas, o estilo de vida dos consumidores alterou-se drasticamente, resultando em menos tempo para adquirir produtos frescos e num aumento pela preferência por produtos confeccionados ou pré-confeccionados. A exigência dos consumidores pela qualidade destas preparações e pelos produtos alimentares em geral também aumentou. As mudanças dos estilos de vida e o aumento da exigência aliados ao fenómeno da globalização que nos permite, cada vez mais, ter acesso a produtos alimentares de todo o mundo, impulsionou a indústria tecnológica das embalagens alimentares a desenvolver novas e melhores formas de transporte e acondicionamento de géneros alimentícios (Dainelli *et al.* 2008; Carochio *et al.* 2015). Neste seguimento surgem então as embalagens alimentares ativas e as embalagens inteligentes.

### **1.3.2. Embalagens Alimentares Ativas**

Apesar de serem consideradas como um conceito atual, a evolução das embalagens convencionais para as embalagens ativas assenta em tradições ancestrais de povos nativos de regiões em África, Ásia e da América do Sul. Estes povos utilizavam folhas para guardar ou transportar alimentos, criando assim uma barreira simples contra alguns agentes externos. Este método também permitia transmitir aos alimentos características das plantas como os aromas, sabores, cores ou substâncias antimicrobianas ou antioxidantes. Esta tradição perdurou até aos tempos modernos, como exemplo temos o caso da Grécia em que alguns queijos tradicionais são envolvidos em folhas para que tenham um processo de amadurecimento adequado (Dainelli *et al.* 2008).

As embalagens ativas interagem deliberadamente com o alimento, permitindo estender o seu tempo de vida útil, mantendo ou melhorando a sua qualidade e as suas propriedades organoléticas, através da libertação de substâncias da embalagem para o alimento ou meio envolvente ou absorção pela embalagem de substâncias do alimento ou do seu meio envolvente (Brody *et al.* 2001; Comissão Europeia 2004; Dainelli *et al.* 2008). Existem muitos sistemas aplicados às embalagens ativas alimentares, destacando os

sistemas absorventes de humidade, os sistemas de captação de oxigénio e etileno, os sistemas emissores em que a embalagem liberta substâncias como conservantes, antioxidantes, sabores e enzimas para evitar a degradação, melhorar o valor nutricional ou as propriedades organoléticas do alimento (Comissão Europeia 2009).

As embalagens ativas podem ser separadas em duas categorias: embalagens ativas absorvedoras e embalagens libertadoras ou emissoras.

As embalagens ativas absorvedoras caracterizam-se por captarem substâncias libertadas pelos alimentos, diretamente dos alimentos ou do meio envolvente. São exemplos deste tipo de embalagens os absorventes de humidade utilizados nas embalagens de produtos cárnicos para eliminar os exsudatos. As embalagens libertadoras ou emissoras são embalagens que libertam compostos ativos, de forma controlada, para que estes possam interagir com os alimentos embalados. Estes compostos podem ser incorporados na matriz da embalagem ou podem ser introduzidos num dispositivo independente. Um exemplo comum são as embalagens libertadoras de etanol que reduzem o crescimento de bolores nos produtos de panificação, aumentando assim o tempo de vida útil dos mesmos (Dainelli *et al.* 2008).

### **1.3.3. Embalagens Alimentares Inteligentes**

As embalagens alimentares inteligentes são definidas como materiais e objetos que monitorizam as condições do alimento embalado ou as condições do meio em que o alimento se encontra tal como a temperatura (Dainelli *et al.* 2008). Segundo o Regulamento (CE) n.º 450/2009, as embalagens alimentares inteligentes são *“informações sobre as condições dos alimentos e não devem libertar os seus constituintes para os alimentos”*, contrariando a principal função das embalagens alimentares ativas. Os sistemas inteligentes podem estar isolados do alimento embalado através de uma barreira funcional ou podem estar no exterior da embalagem (Comissão Europeia 2009).

As embalagens inteligentes são usualmente classificadas de acordo com o parâmetro que é monitorizado. Os indicadores de tempo e temperatura são a tecnologia utilizada há mais tempo neste tipo de embalagens, normalmente utilizados sob a forma de sistemas adesivos em que a cor se altera com as alterações térmicas a que o alimento é sujeito bem como o tempo de armazenamento. Outro tipo de tecnologia utilizada nestas embalagens são os sensores de gás, sendo sensíveis a um tipo de gás no interior da embalagem (ex.: o oxigénio ou dióxido de carbono), atuando como marcadores de qualidade. Também podem ser utilizados como detetores de fugas de gás ou de formação de gases através dos processos naturais de deterioração dos alimentos ou de contaminação microbiana (Yucel 2016).

## 1.4. Proteína de Soro de Leite

As proteínas de leite têm sido abordadas nos últimos 40 anos como potenciais ingredientes ou aditivos alimentares. Quando usados como ingredientes, o leite e os seus produtos derivados têm numerosas vantagens sobre os concorrentes, uma vez que são incolores, têm um sabor suave, sendo moléculas estáveis e essencialmente livre de toxinas (Ramos *et al.* 2014). Na Tabela 1.2 estão representadas as principais proteínas do soro de leite.

**Tabela 1.2.** Principais proteínas presentes no soro de leite bovino (Adaptado de Marshall 2004).

Componentes do soro de leite	%(m/m) de proteína do soro de leite
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	50-55
<b><math>\alpha</math>-lactalbumina</b>	20-25
<b>Albumina</b>	5-10
<b>Imunoglobulina</b>	10-15
<b>Lactoferrina</b>	1-2
<b>Lactoperoxidase</b>	0,5

O leite é constituído essencialmente por dois grupos de proteínas: as caseínas e as proteínas de soro de leite. As primeiras são insolúveis e, portanto, mantêm-se estáveis como uma fase micelar no leite. As caseínas são também as proteínas que estão em maior quantidade no leite (80%) e podem ser facilmente recuperadas a partir de leite desnatado (Ramos *et al.*, 2014). Por outro lado as proteínas de soro de leite apresentam propriedades tecnológicas interessantes tais como: solubilidade, emulsificação e gelatinização (Perez-Gago e Krochta 2000; Pelegrine e Gasparetto 2003; Ngarize *et al.* 2005).

O soro de leite resulta do coalho do fabrico do queijo e, durante muitos anos, foi considerado um poluente da indústria dos lacticínios visto que era normalmente descartado, sem qualquer tratamento, em rios ou terras, representando um grave problema ambiental. Com a evolução da tecnologia e com a descoberta de novas formas de aplicação, atualmente, as proteínas de soro de leite são uma das principais fontes de ingredientes proteicos comerciais, usados em produtos de pastelaria e panificação, na confeção de gelados, fórmulas infantis, bebidas desportivas, entre outros (de Wit 1998; Perez-Gago e Krochta 2000; Pelegrine e Gasparetto 2003; Ramos *et al.* 2014).

Dado o aumento da preocupação ambiental por parte dos consumidores e das indústrias, o interesse pelas embalagens biodegradáveis e edíveis tem aumentado. As embalagens ou filmes edíveis podem ser provenientes de proteínas, hidratos de carbono ou lípidos. Os primeiros incluem proteínas e polissacáridos tais como o amido, o alginato,



derivados de celulose, entre outros. Os lípidos incluem ceras, acilgliceróis e ácidos gordos. Por sua vez, os compósitos podem conter os hidrocolóides e lípidos. A escolha dos materiais para o desenvolvimento de um filme depende das funções pretendidas (Sanches-Silva *et al.* 2014; Khanzadi *et al.* 2015). Os filmes proteicos, além de poderem ser comestíveis, são biodegradáveis e, conseqüentemente contribuem para a redução da acumulação ambiental das embalagens.

As propriedades biológicas e funcionais, bem como as suas aplicações na indústria alimentar também são de destacar, tais como boa digestibilidade, alto valor biológico, propriedades gelificantes, emulsionantes e capacidade de ligação com a água (Sanches-Silva *et al.* 2014; Ramos *et al.* 2014; Khanzadi *et al.* 2015).

A proteína de soro de leite pode ser encontrada sob três formas: a forma concentrada (WPC), a forma isolada (WPI) e a forma hidrolisada (WPH). A WPC apresenta o menor teor proteico, que pode variar entre 25 % e 89 % e, um maior teor de lactose. A WPI apresenta o maior teor proteico, apresentando valores entre os 90-95 %. Por fim, a WPH é a proteína consumida por desportistas, uma vez que, sendo hidrolisada, os aminoácidos presentes são mais facilmente absorvidos pelo organismo. A WPH é a que possui um teor de lactose reduzido e um conteúdo proteico variável (Marshall 2004). Na Tabela 1.3 encontram-se representadas as principais diferenças na composição da WPC e WPI.

**Tabela 1.3.** Composição nutricional do concentrado de proteína de soro de leite (WPC) e de isolado de proteína de soro de leite (WPI) (Adaptado de Ramos *et al.* 2013).

<b>Composição</b>	<b>WPI</b>	<b>WPC</b>	<b>Unidades</b>
<b>Proteína</b>	92,0	82,0	%, m/m
<b>Lactose</b>	1,0	6,0	%, m/m
<b>Lípidos</b>	1,0	1,6	%, m/m
<b>Cálcio (Ca)</b>	389,1	200,0	mg/100g
<b>Sódio (Na)</b>	100,1	400,1	mg/100g
<b>Potássio (K)</b>	31,1	50,2	mg/100g

Às embalagens ativas à base de proteína de soro de leite podem ser incorporados aditivos que são responsáveis pela função ativa das embalagens. Estes aditivos podem ser compostos naturais como os extratos de plantas aromáticas.

## 1.5. Plantas Aromáticas

As plantas aromáticas estão fortemente ligadas à civilização humana e à sua evolução, uma vez que são utilizadas em várias medicinas tradicionais e nas diversas gastronomias

desde os seus primórdios. Estas plantas têm na sua constituição uma ampla gama de compostos com propriedades farmacológicas que, ainda hoje, são utilizadas na medicina contemporânea. Mais de 25 % dos medicamentos produzidos e utilizados no mundo inteiro são derivados de plantas. Surgem assim os medicamentos naturais ou derivados de compostos naturais, em que a totalidade ou parte do medicamento tem origem num composto ativo de uma planta aromática ou medicinal. São exemplos destes medicamentos o paclitaxel (Taxol®), alcalóide diterpénico usado no tratamento de alguns tumores devido à sua ação antineoplásica, que resulta do seu efeito anti-mitótico e que é derivado da casca do *Taxus brevifolia* ou o vinblastina, outro anticancerígeno, derivado da *Catharanthus roseus* também conhecida como *Vinca roseus*. Por sua vez, nas confeções culinárias, as plantas aromáticas são utilizadas para acrescentar ou realçar algum sabor, além de serem importantes para uma dieta saudável e equilibrada (Piccaglia *et al.* 1993; Rates 2001; Lubbe e Verpoorte 2011; Kala 2015; Barata *et al.* 2016). O uso das plantas aromáticas nas confeções culinárias, foi recomendada pela Direção Geral de Saúde para a redução de sal na alimentação dos portugueses (Lopes *et al.* 2015).

Os extratos e óleos essenciais provenientes destas plantas têm na sua constituição vários compostos ativos (vitaminas, flavonóides, terpenos, carotenoides, cumarinas, etc.) responsáveis pelas várias atividades biológicas e pela defesa natural das plantas, nomeadamente as atividades antioxidantes e antimicrobianas e, podem ser extraídos por diversos processos (Calucci *et al.* 2003). Mais de 150 óleos essenciais e extratos destas plantas aromáticas são reconhecidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Food And Drug Administration 2016). Entre os compostos responsáveis pelas várias propriedades biológicas das plantas aromáticas, destacam-se os compostos fenólicos (Costa *et al.* 2015).

Especificamente, as plantas da família Lamiaceae, são conhecidas por terem um grande poder antioxidante podendo assim fornecer proteção contra doenças neurodegenerativas, oncológicas e cardiovasculares. Apresentam também forte atividade antimicrobiana, antiviral e anti-tumoral (Chan *et al.* 2012). Os orégãos (*Origanum vulgare* L.), o manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e a hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.), são alguns exemplos de plantas pertencentes a esta família.

### **1.5.1. Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são substâncias aromáticas voláteis produzidas por todas as plantas como metabolitos secundários com a propósito da proteção contra agentes bióticos (microrganismos, insetos, animais herbívoros, etc.) e abióticos (radiação UV, seca, variações

de temperatura, etc.), podendo ser utilizados pelas indústrias de cosmética, farmacêutica e alimentar para múltiplos propósitos, como por exemplo em perfumes, cosméticos, detergentes, medicamentos, entre outros (Nabavi *et al.* 2015; Pavela 2015). Podem ser obtidos a partir das distintas partes das plantas como as sementes, o caule, as folhas, as flores, entre outros. A composição destas substâncias depende não só da parte da planta da qual são extraídos, mas também do método de extração utilizado (Dvaranauskaitė *et al.* 2009; Hill *et al.* 2013; Pavela 2015). Os óleos essenciais são usados desde a antiguidade pelo Homem como aromatizantes e fragâncias, ainda atualmente são utilizados pela indústria cosmética para tratamentos e cuidado da pele e cabelo (Nakatsu *et al.* 2000; Aburjai e Natsheh 2003). Relativamente ao seu uso medicinal, os óleos essenciais são utilizados nas medicinas tradicionais da Índia (Ayurveda) e da China (Zhong Yo). Na indústria farmacêutica atual, estes compostos têm chamado a atenção dado o seu potencial anticancerígeno contra a leucemia, o cancro da mama e o cancro do colon e intestino e, a possibilidade da supressão de tumores do fígado, dos pulmões e de células gliais (glioma) (Nakatsu *et al.* 2000; Edris 2007).

Os métodos de extração mais utilizados são a hidrodestilação, a destilação a vapor, extração com recurso a um solvente, extração por micro-ondas e extração com fluidos supercríticos. No entanto, à escala laboratorial, a destilação a vapor e a hidrodestilação são os métodos mais utilizados (Khajeh *et al.* 2005; Edris 2007; Bendahou *et al.* 2008; Dvaranauskaitė *et al.* 2009; Romano *et al.* 2009).

Os óleos essenciais provenientes de plantas aromáticas apresentam propriedades biológicas que podem ser do interesse das indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Nomeadamente as atividades antioxidante e antimicrobiana, são do interesse da indústria alimentar uma vez que estes óleos podem vir a substituir os antioxidantes sintéticos, garantindo uma maior segurança para os consumidores. Os óleos essenciais de manjerição (*Ocimum basilicum* L.), flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.), semente de cardamomo (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) são considerados GRAS pela FDA (Food And Drug Administration 2016; Cacho *et al.* 2016).

### **1.5.2. Extratos de Plantas Aromáticas**

Tal como foi descrito anteriormente, as propriedades biológicas das plantas aromáticas são altamente reconhecidas em várias áreas de conhecimento, desde a medicina até à conservação de alimentos. Essas propriedades biológicas provêm de compostos naturais presentes nas plantas que têm uma ação protetora contra predadores, radiação,

entre outros. Devido a estas ações protetoras, os extratos de especiarias e plantas aromáticas têm sido alvo de vários estudos (Samotyja e Małecka 2007).

Os extratos das plantas aromáticas são preparados de forma a possuírem os compostos com as propriedades biológicas da forma mais purificada possível. Estes compostos dividem-se em várias categorias incluindo os terpenos e os compostos fenólicos (Ozdikicierler *et al.* 2014). O uso destes extratos como aditivos alimentares pode ter um papel preponderante na qualidade microbiológica, química e sensorial dos alimentos e muitos dos extratos de plantas aromáticas são considerados GRAS (Negi 2012; Food And Drug Administration 2016). Os extratos podem ser obtidos através de vários métodos de extração como a extração sólido-líquido (que pode recorrer em banhos ultrassónicos), a extração com líquido pressurizado (PFE – do inglês, *Pressurised Fluid Extration*), extração ultrassónica (USE – do inglês, *Ultrasonic Extraction*) e extração de refluxo (*Reflux extraction*). Com estes métodos, vários solventes podem ser ainda utilizados como o metanol, etanol, acetona, hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, entre outros. (Costa *et al.* 2015; Chua *et al.* 2016).

Devido à grande complexidade da composição dos extratos de plantas, é extremamente difícil atribuir a capacidade antioxidante de um extrato a um determinado composto ou a um determinado conjunto de compostos. Esta capacidade vai depender de múltiplos fatores tais como o tipo de matriz, a concentração ou o efeito sinérgico dos compostos principais e os compostos presentes em menor quantidade (Almela *et al.* 2006).

A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas aromáticas também é largamente reconhecida, tornando estes extratos numa boa opção para o seu uso como aditivos alimentares, promovendo a conservação dos alimentos (Negi 2012).

### **1.5.3. Compostos Fenólicos**

Presentes na maioria das plantas comestíveis, e, em consequência, muito presentes na dieta humana, os compostos fenólicos são constituídos por, pelo menos, um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilos. Com mais de 8000 estruturas conhecidas, estes compostos fazem parte dos metabolitos secundários das plantas, contribuindo para a sua defesa contra a radiação ultravioleta e contra organismos patogénicos, parasitas e predadores. São também responsáveis pela coloração e pelas propriedades organolépticas das plantas, contribuindo, por exemplo, para o sabor amargo dos frutos e sumos de fruta. Estão distribuídos por todas as partes da planta, mas a distribuição não é quantitativamente igual, variando de acordo com a parte da planta. A família das Lamiáceas (Lamiaceae antes conhecida como Labiatae) é caracterizada por ser composta por várias espécies de plantas

que contém alto conteúdo em compostos fenólicos (Robards 2003; Moreno *et al.* 2006; Spáčil *et al.* 2008; Dai e Mumper 2010).

A identificação e quantificação destes compostos pode ser feita recorrendo à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) usando uma coluna C<sub>18</sub>, com um detetor de díodos (DAD – do inglês *Diode Array Detection*). Pode-se também utilizar Ressonância Magnética Nuclear (NMR – do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), Espectroscopia de Infravermelhos (NIR – do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) ou acoplar o HPLC a um Espectrómetro de Massas (MS – do inglês *Mass Spectrometry*) (Robards 2003; Almela *et al.* 2006).

Segundo Ho (1992) os compostos fenólicos podem ser divididos em fenóis simples e ácidos fenólicos, derivados de ácido hidroxicinâmico (ex.: ácido rosmarínico) e flavonoides.

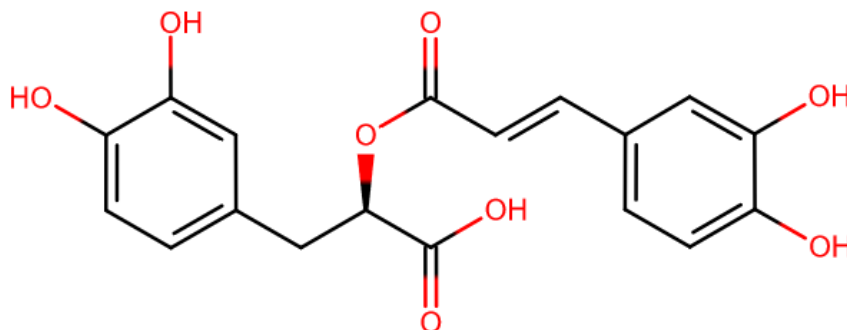
Por outro lado, segundo os autores Dai e Mumper (2010), os compostos fenólicos podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Os ácidos fenólicos estão subdivididos em duas classes: a classe dos derivados do ácido benzoico (ex.: ácido gálico) e os derivados do ácido cinâmico (ex.: ácidos cumárico, cafeico e ferúlico). Por sua vez os flavonoides contêm 15 átomos de carbono na sua estrutura dispostos em três anéis (C6-C3-C6). São divididos em grupos de acordo com o estado de oxidação do anel central de carbono. Os taninos, à semelhança dos flavonoides, estão muito presentes na dieta humana. São normalmente divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. O primeiro grupo diz respeito aos taninos que são compostos por um núcleo central de glucose ou outro poliol esterificado com ácido gálico ou um composto similar. O segundo grupo corresponde aos taninos condensados ou proantocianidinas (Dai e Mumper 2010).

Os compostos fenólicos são responsáveis por diversas propriedades das plantas aromáticas, incluindo a capacidade antioxidante e a capacidade antimicrobiana. Esta propriedade é muito importante para a saúde humana uma vez que ajuda a prevenir doenças causadas pelo *stress* oxidativo das células como o cancro, doenças neurodegenerativas, inflamações crónicas e doenças cardiovasculares (Piccaglia *et al.* 1993; Sartoratto *et al.* 2004; Proestos *et al.* 2006; Dai e Mumper 2010).

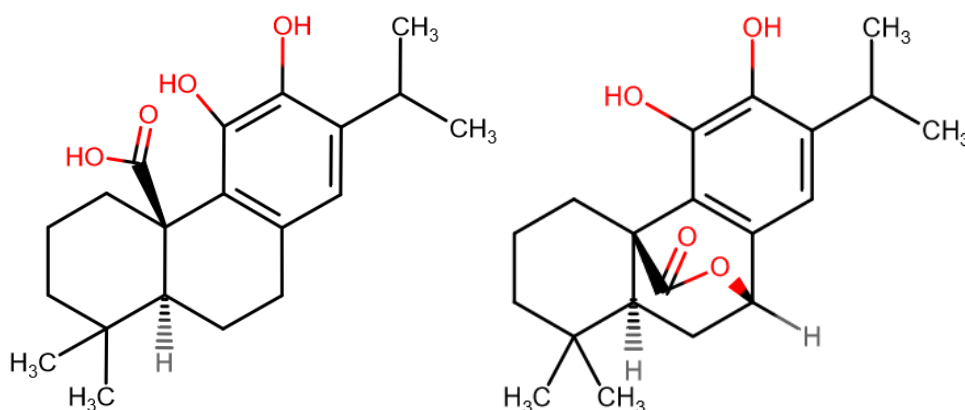
A extração destes compostos para a sua posterior aplicação pode ser feita através de plantas frescas, congeladas ou secas, geralmente trituradas ou moídas. O processo de trituração ou moagem é geralmente precedido por liofilização ou secagem ao ar, sendo a liofilização o processo que retém níveis mais altos de compostos fenólicos (Dai e Mumper 2010).

Os principais compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos de alecrim e tomilho são o ácido rosmarínico (Fig. 1.4) e o ácido

carnósico (Fig. 1.5) (Jacotet-Navarro *et al.* 2015). O carnosol (Fig. 1.5) é um derivado hidroxilado oxidativo do ácido carnósico com propriedades anticancerígenas e antioxidantes (Lo *et al.* 2002; Johnson 2011) também presente no alecrim.



**Fig. 1.4.** Estrutura química do ácido rosmarínico  
(Fonte: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/viewer/537-15-5>).



**Fig. 1.5.** Estrutura química do ácido carnósico (esquerda) e do carnosol (direita)  
(Fonte: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/viewer/537-15-5>).

#### 1.5.4. Propriedades Biológicas

As plantas aromáticas são conhecidas por possuírem diversas propriedades biológicas, muito dependentes dos seus metabolitos secundários. O ácido rosmarínico, o carvacrol, o ácido cafeico e o timol são alguns destes compostos que são responsáveis pelas atividades anticancerígenas, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-mutagénica, anti-inflamatória, entre outras (Hossain *et al.* 2011).

##### 1.5.4.1. Capacidade Antioxidante

Os antioxidantes são compostos capazes de atrasar, inibir ou prevenir a oxidação de moléculas por capturarem radicais livres, diminuindo assim o *stress* oxidativo (Dai e Mumper 2010). Devido ao aumento da incidência de doenças oncológicas, cardiovasculares,

inflamatórias e degenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, os antioxidantes de origem natural têm tido uma maior atenção por parte de várias indústrias, nomeadamente das indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. Estas doenças, na sua grande maioria, são causadas pelos efeitos nocivos dos radicais livres que, para além de causar o desenvolvimento destas doenças podem promover a aterosclerose ou mesmo acelerar o processo de envelhecimento dos tecidos. Entre os compostos antioxidantes destacam-se as vitaminas A, B6, C e E, o zinco, o selénio e os compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos fenólicos e os flavonoides (Spáčil *et al.* 2008).

Nas indústrias alimentar e cosmética, a prevenção da oxidação dos alimentos com alto teor lipídico é habitualmente realizada por meio de antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o hidroxitolueno butilado (BHT – do inglês *Butylated Hydroxytoluene*) e o hidroxianisol butilado (BHA – do inglês *Butylated Hydroxyanisole*), uma vez que são compostos estáveis e de baixo custo. Apesar destas vantagens, o seu uso em alimentos e preparações alimentares tem vindo a ser posto em causa uma vez que a sua ação no organismo humano tem sido relacionada com a promoção da carcinogénese (Pereira de Abreu *et al.* 2010). Este facto, aliado a uma maior preferência dos consumidores por produtos naturais, tem fomentado o interesse nos últimos anos, tanto por parte da comunidade científica como por parte das indústrias, pela procura e substituição de aditivos sintéticos por aditivos alimentares naturais (Ho 1992; Cuvelier *et al.* 1996; Erkan *et al.* 2008).

Sendo de origem natural, os tocoferóis são uns dos antioxidantes mais importantes para a indústria uma vez que são capazes de inibir a peroxidação lipídica pela captação dos radicais peróxido (Ho 1992).

A capacidade antioxidante de extratos metanólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) foi reportada em diversos estudos (Zheng e Wang 2001; Hossain *et al.* 2008).

A capacidade antioxidante dos extratos de origem natural é determinada por múltiplos fatores, nomeadamente pela concentração dos mesmos. Os compostos que possuem capacidade antioxidante, desempenham essa capacidade em determinadas doses ideais de concentração. Exceder essa concentração ótima pode resultar no efeito contrário e na ocorrência de efeitos pró-oxidativos, regenerando os radicais peróxido (Negi 2012).

O potencial antioxidante dos extratos de plantas é um resultado da presença, não só dos compostos fenólicos, mas também de outros componentes que podem ocorrer em quantidades menores, obtendo assim um efeito sinérgico (Negi 2012).

#### **1.5.4.1.1. Métodos para determinar a capacidade antioxidante**

#### **1.5.4.1.2. Sistema de inibição do radical livre DPPH**

O método que utiliza o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), assenta na capacidade da amostra em captar o DPPH $\cdot$ . Este método avalia a eficácia de um antioxidante à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica das moléculas testadas, através da reação das amostras com uma solução metanólica de DPPH $\cdot$ . A redução ou captação do radical é monitorizada pela diminuição da absorvância da amostra num comprimento de onda característico (515 nm) (Brand-Williams *et al.* 1995; Bondet *et al.* 1997; Sánchez-Moreno *et al.* 1998).

#### **1.5.4.1.3. Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno**

O  $\beta$ -caroteno é uma molécula conhecida pelo seu poder antioxidante, que se traduz na inativação de determinadas espécies de reativas de oxigénio, nomeadamente no oxigénio atómico (Phan-Thi *et al.* 2016). O ensaio do branqueamento (descoloração) do  $\beta$ -caroteno, muito usado na medição da capacidade antioxidante de extratos de plantas, mede a ação de uma substância antioxidante contra a auto-oxidação de uma emulsão de ácido linoleico e  $\beta$ -caroteno (Kato *et al.* 2009).

#### **1.5.4.2. Capacidade Antimicrobiana**

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS ou WHO, do inglês *World Health Organization*), as doenças de origem alimentar, causadas pela presença de microrganismos, são responsáveis por várias doenças agudas e/ou crónicas. A OMS estima que, por ano, 600 milhões de pessoas a nível mundial são afetadas por doenças causadas por alimentos contaminados. Destes 600 milhões, 420 000 morrem todos os anos, sendo 125 000 crianças com menos de 5 anos. A diarreia é a doença com origem em alimentos contaminados mais comum, afetando 550 milhões de pessoas e causando 230 000 mortes todos os anos. A OMS considera que as bactérias *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enterohaemorrágica, *Listeria* e *Vibrio cholerae* são as principais responsáveis pelas contaminações alimentares (Organização Mundial de Saúde 2015).

O combate aos microrganismos patogénicos torna-se, assim, uma prioridade para a indústria alimentar e realiza-se, muitas vezes, com recurso aos aditivos alimentares. Como foi descrito anteriormente, desde os primórdios das civilizações, na Suméria, China e Índia, que as plantas aromáticas são utilizadas para a conservação de alimentos por possuírem compostos ativos eficazes contra microrganismos. Esses compostos estão presentes nos



extratos e óleos essenciais obtidos a partir das plantas aromáticas, que ganham atualmente um novo interesse por parte da indústria alimentar.

Oussalah *et al.* (2007) testaram vinte e oito óleos essenciais provenientes de plantas aromáticas contra quatro bactérias: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium. Concluíram que os óleos essenciais provenientes de *Corydothymus capitatus* (orégão espanhol), *Cinnamomum cassia* (canela chinesa), *Cinnamomum verum* (canela do Ceilão), *Satureja montana* (segurelha) e *Origanum heracleoticum* (orégão grego) foram os óleos que apresentaram melhor capacidade antimicrobiana contra os microrganismos testados, sendo o óleo essencial da orégão espanhol o mais eficiente (Oussalah *et al.* 2007). Noutro estudo dos mesmos autores, verificou-se a eficácia do óleo essencial proveniente de *C. capitatus* contra uma estirpe de *Pseudomonas putida*, com origem na carne. Neste trabalho, os autores comprovaram a eficácia de mais de 5 óleos essenciais extraídos das plantas *C. cassia* (canela chinesa), *Origanum compactum* (orégão), *Origanum heracleoticum* (orégão grego), *Satureja hortensis* (segurelha de verão), *Satureja montana* (segurelha de inverno) contra a mesma estirpe (Oussalah *et al.* 2006).

### 1.5.5. Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (Fig. 1.6) é uma planta aromática nativa da zona da bacia do mediterrâneo, pertencente à família Lamiaceae, e usada desde a antiguidade para diversos fins medicinais e culinários. Na gastronomia é utilizado, seco ou fresco, para temperar peixe, carnes vermelhas e brancas, sopas e em chá. É bastante usado nas medecinas tradicionais para diversos fins, nomeadamente para aliviar cólicas renais, dores de estomago e a dismenorreia e utilizado para facilitar a digestão. Também é conhecido por ter capacidades antioxidante, antimicrobiana e anticancerígenas. A planta do alecrim é um arbusto, podendo atingir os 2 m de altura, muito cultivada pelo seu óleo essencial e para controlar a erosão dos solos (Cuvelier *et al.* 1996; Almela *et al.* 2006; González-Trujano *et al.* 2007; Ribeiro-Santos *et al.* 2015). Na Tabela 1.4 encontra-se a composição nutricional do alecrim (Agencia Española de Seguridad Alimentaria 2007; Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione 2009; United States Department of Agriculture 2016). Na Tabela 1.5 encontram-se compilados os principais compostos fenólicos do alecrim e dos seus extratos e óleos essenciais.



**Fig. 1.6.** Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).  
(Fonte: <http://www.webligadao.com/imagens/artigo59.2.png>).

Devido à sua grande capacidade antioxidante, o alecrim tem sido proposto para a sua utilização como conservante alimentar, quer como extrato quer na forma natural. De facto, o uso do extrato de alecrim como aditivo alimentar foi autorizado pela Comissão Europeia (Diretivas 2010/67/EU e 2010/69/EU) (Comissão Europeia 2010a; Comissão Europeia 2010b).

**Tabela 1.4.** Composição nutricional por 100 g de alecrim segundo as bases de dados de composição nutricional americana (USDA), italiana (IT) e espanhola (BEDCA).

	Unidades	Alecrim Fresco		Alecrim Seco	
		USDA	IT	USDA	BEDCA
<b>Valor Energético</b>	kcal	131	96	331	345
<b>Macronutrientes</b>					
<b>Água</b>	g	67,77	72,5	9,31	9,3
<b>Proteína</b>	g	3,31	1,4	4,88	5
<b>Lípidos</b>	g	5,86	4,4	15,22	15,2
<b>Hidratos de Carbono</b>	g	20,7	13,5	64,06	46,4
<b>Fibra</b>	g	14,1	-	42,6	24,1
<b>Minerais</b>					
<b>Cálcio (Ca)</b>	mg	317	370	1280	317
<b>Ferro (Fe)</b>	mg	6,65	8,5	29,25	28,9
<b>Magnésio (Mg)</b>	mg	91	-	220	150
<b>Fosforo (P)</b>	mg	66	20	70	50
<b>Potássio (K)</b>	mg	668	280	955	550
<b>Sódio (Na)</b>	mg	26	15	50	50
<b>Zinco (Zn)</b>	mg	0,93	-	3,23	0,93
<b>Vitaminas</b>					
<b>Vitamina C</b>	mg	21,8	29	61,2	50
<b>Tiamina</b>	mg	0,036	0,1	0,514	0,5
<b>Riboflavina</b>	mg	0,152	-	0,428	0
<b>Niacina</b>	mg	0,912	-	1	1
<b>Vitamina B6</b>	mg	0,336	-	1,74	0
<b>Folatos</b>	µg	109	-	307	0
<b>Lípidos</b>					
<b>Ácidos gordos saturados</b>	g	2,838	-	7,371	7,37
<b>Ácidos gordos monoinsaturados</b>	g	1,16	-	3,014	3,01
<b>Ácidos gordos polinsaturados</b>	g	0,901	-	2,339	2,34

**Tabela 1.5.** Compostos fenólicos determinados no alecrim, nos seus extratos e nos seus óleos essenciais.

Alecrim	Parte da Planta	Compostos principais	Conteúdo	Unidade	Referência
<b>Óleo essencial</b>	Planta seca	Eucaliptol	88,9	%	Daferera <i>et al.</i> 2000
		$\alpha$ -pineno	2,7		
		Cânfora	2,4		
		Borneol	1,5		
<b>Extrato metanólico</b>	Folhas e ramos secos	Ácido rosmarínico	1286,4	mg/100 g peso seco	Shan <i>et al.</i> 2005
		Epirosmanol	1113		
		Carnosol	801,6		
		Ácido carnósico	655,2		
		Derivados de ácido cafeico	278,1		
		Rosmadial	277,3		
		Catequina	254,9		
		Ácido cafeico	40,1		
<b>Extrato metanólico</b>	Planta seca	Ácido ferúlico	5,2	mg/100 g peso seco	Proestos <i>et al.</i> 2005
		Ácido gentísico	3,2		
		Ácido cafeico	2		
		Ácido siríngico	2		
		Ácido vanílico	2		
		Luteolina	1,6		
		(+)-Catequina, hidratada	1,5		
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	1,4		
<b>Planta Fresca Liofilizada</b>	Planta	Luteolina	616	mg/100 g peso seco	Wojdyło <i>et al.</i> 2007
		Ácido cafeico	406		
		Apigenina	43,8		
		Ácido ferúlico	36,2		
<b>Extrato metanólico</b>	Planta Fresca	Ácido rosmarínico	6,95	mg/100 g peso seco	Hossain <i>et al.</i> 2010
	Planta Liofilizada	Ácido rosmarínico	15,5		
	Planta Seca	Ácido rosmarínico	22,7		

O alecrim tem como compostos principais o ácido rosmarínico, o ácido carnósico o carnosol (derivado do ácido carnósico). Estes componentes são compostos fenólicos com grande capacidade antioxidante, protegendo contra os danos provocados pelos radicais livres. No que diz respeito ao ácido rosmarínico, têm sido descritas várias atividades biológicas tais como antiviral, antibacteriana e anti-mutagénica em conjunto com possíveis efeitos terapêuticos para doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson. O ácido rosmarínico é também o grande responsável pela atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais obtidos a partir desta planta. Relativamente ao

ácido carnósico e ao carnosol, tem sido provado que estes possuem atividades anti-tumoral e anti-inflamatória. As concentrações destes compostos na planta podem variar de acordo com diversos fatores edafoclimáticos (ex.: localização geográfica da planta, a altura da colheita, a disponibilidade de água e outros nutrientes, temperatura do meio ambiente) (Cuvelier *et al.* 1996; Moreno *et al.* 2006; Almela *et al.* 2006; González-Trujano *et al.* 2007; Ribeiro-Santos *et al.* 2015).

#### 1.5.6. Tomilho

À semelhança do alecrim, o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (Fig. 1.7) é um arbusto pertencente à família Lamiaceae, originária da Europa, principalmente da bacia do Mediterrâneo. Por ser uma espécie que se adapta facilmente a várias condições climáticas, encontra-se difundida um pouco por todo o planeta. Considerada uma planta medicinal e aromática, tem uma importância crescente na economia da Europa, Ásia, América do Norte e no Norte de África (Król e Kiełtyka-Dadasiewicz 2015; Ferreira *et al.* 2016). Na Tabela 1.6 encontra-se representada a composição nutricional do tomilho (Agencia Española de Seguridad Alimentaria 2007; French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety 2013; Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology 2015; United States Department of Agriculture 2016). Na Tabela 1.7 encontram-se representados os compostos fenólicos principais dos extratos e óleos essenciais do tomilho.



**Fig. 1.7.** Ramos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)  
(Fonte: [http://www.bookyourplants.com/images/herbs/thyme\\_samplepic.png](http://www.bookyourplants.com/images/herbs/thyme_samplepic.png)).

O óleo essencial do tomilho, considerado um dos dez mais importantes óleos essenciais de plantas, detém atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e expetorante. O extrato de tomilho é também dotado de uma potente atividade antioxidante, de agentes hepatoprotetores e considerado antiespasmódico. Estas atividades tornam não só o óleo essencial do tomilho, mas também o seu extrato, em fortes candidatos para o seu uso como aditivo alimentar assim como apelativos para a indústrias cosmética e farmacêutica. Os compostos fenólicos dos óleos e dos extratos de tomilho são os principais responsáveis pela

sua atividade biológica (Fecka e Turek 2008; Król e Kiełtyka-Dadasiewicz 2015; Gavarić *et al.* 2015).

**Tabela 1.6.** Composição nutricional por 100 gr de tomilho segundo as bases de dados de composição nutricional americana (USDA), francesa (ANSES), espanhola (BEDCA) e japonesa (JP).

	Unidades	Tomilho Fresco	Tomilho Seco			
		USDA	USDA	ANSES	BEDCA	JP
<b>Valor Energético</b>	kcal	101	276	291	336	352
<b>Macronutrientes</b>						
<b>Água</b>	g	65,11	7,79	7,8	7,8	9,8
<b>Proteína</b>	g	5,56	9,11	6,07	9,1	6,5
<b>Lípidos</b>	g	1,68	7,43	4,94	7,4	5,2
<b>Hidratos de Carbono</b>	g	24,45	63,94	41,7	57,1	69,8
<b>Fibra</b>	g	14	37	27,8	18,6	-
<b>Minerais</b>						
<b>Cálcio (Ca)</b>	mg	405	1890	1260	1890	1700
<b>Ferro (Fe)</b>	mg	17,45	123,6	82,4	123,6	110
<b>Magnésio (Mg)</b>	mg	160	220	110	220	300
<b>Fosforo (P)</b>	mg	106	201	134	201	85
<b>Potássio (K)</b>	mg	609	814	541	814	980
<b>Sódio (Na)</b>	mg	9	55	36,7	55	13
<b>Zinco (Zn)</b>	mg	1,81	6,18	6,19	-	2
<b>Vitaminas</b>						
<b>Vitamina C</b>	mg	160,1	50	16,7	0	0
<b>Tiamina</b>	mg	0,048	0,513	0,341	0,51	0,09
<b>Riboflavina</b>	mg	0,471	0,399	0,266	0,4	0,69
<b>Niacina</b>	mg	1,824	4,94	3,28	4,94	3,4
<b>Vitamina B6</b>	mg	0,348	0,55	0,31	0	-
<b>Folatos</b>	µg	45	274	91,3	0	0
<b>Vitamina A (Equivalentes de retinol)</b>	µg	238	190	-	380	82
<b>Lípidos</b>						
<b>Ácidos gordos saturados</b>	g	0,467	2,73	2,73	-	1,92
<b>Ácidos gordos monoinsaturados</b>	g	0,081	0,47	0,47	-	0,33
<b>Ácidos gordos polinsaturados</b>	g	0,532	1,19	1,33	-	0,83

**Tabela 1.7.** Principais compostos fenólicos determinados no tomilho, nos seus extratos e nos seus óleos essenciais.

Tomilho	Parte da planta	Principais compostos	Conteúdo	Unidade	Referência
Óleo essencial	Planta seca	$\alpha$ -terpineno	1	%	Daferera <i>et al.</i> 2000
		<i>p</i> -cimeno	23,5		
		$\gamma$ -terpineno	4,3		
		Borneol	1,4		
		Carvacrol	2,2		
		Timol	63,6		
Óleo Essencial	Planta seca	Timol	46,21	%	Özcan e Chalchat 2004
		$\gamma$ -terpineno	14,08		
		<i>p</i> -cimeno	9,91		
		linalol	3,99		
		mirceno	3,45		
		$\alpha$ -pineno	2,97		
		$\alpha$ -tujona	2,84		
Extrato metanólico	Folhas e ramos secos	Ácido rosmarínico	681,1	mg/100 g peso seco	Shan <i>et al.</i> 2005
		Timol	591,4		
		Ácido <i>p</i> -cumárico	55,9		
		Ácido cafeico	54,8		
		Ácido gálico	37,5		
Extrato metanólico	Planta Seca	Luteolina	36	mg/100 g peso seco	Proestos <i>et al.</i> 2005
		Ácido cafeico	5,8		
		Ácido siríngico	5		
		Ácido gentísico	2,8		
		Apigenina	4		
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	1,4		
		Ácido <i>p</i> -cumárico	1,2		
		(-)-epicatequina	0,3		
Extrato	Folhas secas	Timol	8,554	mg/g	Lee <i>et al.</i> 2005
		Carvacrol	0,681		
		Linalol	0,479		
		$\alpha$ -terpineol	0,291		
		Eugenol	0,245		
		Borneol	0,244		
		$\alpha,\alpha$ -fenil etil dimetil	0,163		
		Cânfora	0,148		
		4-Teroineol	0,111		
Planta Fresca	Planta liofilizada	Ácido cafeico	517	mg/100 g peso seco	Wojdyło <i>et al.</i> 2007
		Ácido ferúlico	90,5		

## 1.6. Análise Sensorial

Muitas vezes, quando desenvolvemos um determinado produto alimentar, o adequado valor nutricional do produto e a sua segurança, não são suficientes para atrair o consumidor. Os consumidores, ao fazerem uma compra, estão a fazer uma escolha sobre uma variedade de produtos alimentares. Escolha essa que depende de vários fatores (Civille e Oftedal 2012). Gorton e Barjolle (2013) dividiram esses fatores em três categorias baseadas nas características do indivíduo que adquire o produto, nas características do produto e nas características do meio social e físico no qual o indivíduo está incluído. Para a criação e/ou desenvolvimento de um determinado produto, estas características têm que ser tidas em conta para que o produto em questão tenha sucesso num mercado cada vez mais exigente. No que diz respeito à categoria baseada nas características do produto, esta inclui fatores como o sabor, a aparência, a textura, a relação custo/qualidade, entre outros. A análise sensorial emerge assim com o objetivo de ajudar a caracterizar esses fatores (Gorton e Barjolle 2013).

A análise sensorial utilizada na área alimentar compreende um conjunto de métodos científicos empregues com a finalidade de medir objetivamente as respostas subjetivas humanas, percebidas pelos sentidos do organismo humano, em relação às características organoléticas de determinado produto alimentar. A metodologia contempla a utilização de um painel previamente escolhido ou treinado e obedece a métodos que foram desenvolvidos para identificar e quantificar informações sobre as características sensoriais dos produtos (Teixeira 2009; Lawless e Heymann 2010). Atualmente é amplamente utilizada na indústria alimentar para várias finalidades, incluindo no controlo de qualidade, no *design* e marketing do produto e na avaliação e manutenção da qualidade alimentar (Zeng *et al.* 2008). Num mercado cada vez mais competitivo e global, esta ferramenta não pode ser subvalorizada uma vez que a qualidade sensorial de um produto alimentar pode fidelizar um consumidor (Teixeira 2009).

Existem três tipos de provas de análise sensorial: a análise discriminativa, a análise descritiva e a análise afetiva. A primeira tem o objetivo de determinar se os produtos são percebidos de maneira diferente pelo consumidor. O painel composto para esta prova tem que ser recrutado pela sua sensibilidade sensorial e deve ser treinado. A análise afetiva determina a aceitabilidade de consumo do produto e o painel é escolhido de acordo com o uso do produto e não precisa de ser treinado. A análise descritiva determina as diferenças organoléticas entre produtos. O painel tem que ser treinado e tem que estar motivado para a análise (Domínguez 2008). No âmbito da componente prática do presente estudo e com



vista a uma melhor avaliação da embalagem ativa alimentar desenvolvida, realizaram-se provas sensoriais descritivas.

Uma análise sensorial descritiva exige um painel de provadores treinado de forma a que estes consigam realizar uma avaliação deixando de lado as suas preferências pessoais. Esta análise é indicada para avaliar produtos alimentares que tenham sofrido alguma modificação, como por exemplo a mudança de um ingrediente ou de algum método de processamento, uma vez que pode obter informações detalhadas de um determinado produto. O painel tem que conter entre 8 a 15 provadores escolhidos previamente pela sua motivação e sensibilidade sensorial. O painel avalia o produto selecionado de acordo com alguns descritores discutidos previamente e com a ajuda de uma escala, usualmente de 1 a 5 (Domínguez, 2008).

Em qualquer tipo de análise sensorial, o espaço onde decorrem as provas tem que ser isento de odores, tranquilo e silencioso, as paredes devem ser brancas e a iluminação deve ser monocromática, de preferência luz natural.

## Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e otimização de um filme ativo, biodegradável e edível, à base de proteína de soro de leite e incorporado com extratos de plantas aromáticas, a fim de evitar a oxidação lipídica de alimentos com alto teor lipídico.

Para alcançar este fim, pretende-se comparar extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), bem como as suas combinações, no que respeita à sua capacidade antioxidante. Depois de escolhido o extrato ou mistura com melhor capacidade antioxidante, este será avaliado no que respeita à sua atividade antimicrobiana e serão quantificados os principais compostos fenólicos.

Posteriormente será otimizado o procedimento de preparação do filme, nomeadamente no que respeita à quantidade de plastificante (glicerol) e de extrato ativo a serem incorporados na proteína de soro de leite. A eficácia antioxidante do novo filme ativo será estudada embalando um alimento modelo com alto teor lipídico durante diferentes tempos de armazenamento e avaliando o estado da oxidação lipídica do alimento por diferentes métodos (índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina, ensaio de TBARS e ensaio do hexanal). A eficácia antimicrobiana também será avaliada em relação a vários microrganismos (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*). Por último, de modo a conhecer a eventual aceitação desta nova embalagem alimentar por parte dos consumidores será realizada uma análise sensorial do novo filme ativo por um painel de provadores.

## Material e Métodos

Todos os métodos descritos e utilizados foram realizados no laboratório do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, com a exceção da análise sensorial que foi realizada na Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril.

### 3.1. Plantas Aromáticas

As plantas aromáticas selecionadas para o presente estudo foram o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

Foram adquiridas 3 marcas diferentes (marca A, marca B, marca C) destas duas plantas aromáticas em espaços comerciais da região de Lisboa, Portugal, entre Novembro de 2015 e Abril de 2016. Apenas as folhas secas das plantas aromáticas foram adquiridas tal como demonstra a Fig. 3.1. As amostras foram trituradas individualmente utilizando o moinho granulador a 10000 rpm, durante 20 a 30 segundos. As amostras foram embaladas a vácuo, protegidas da luz, e armazenadas numa câmara frigorífica a 5 °C, antes da sua utilização.



**Fig. 3.1.** Folhas secas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

## 3.2. Preparação dos Extratos de Plantas Aromáticas

### 3.2.1. Reagentes e Solventes

Como solventes de extração do alecrim e tomilho, utilizaram-se etanol absoluto e acetona da Merck (Darmstadt, Alemanha) e metanol de grau HPLC (J.T. Baker, EUA).

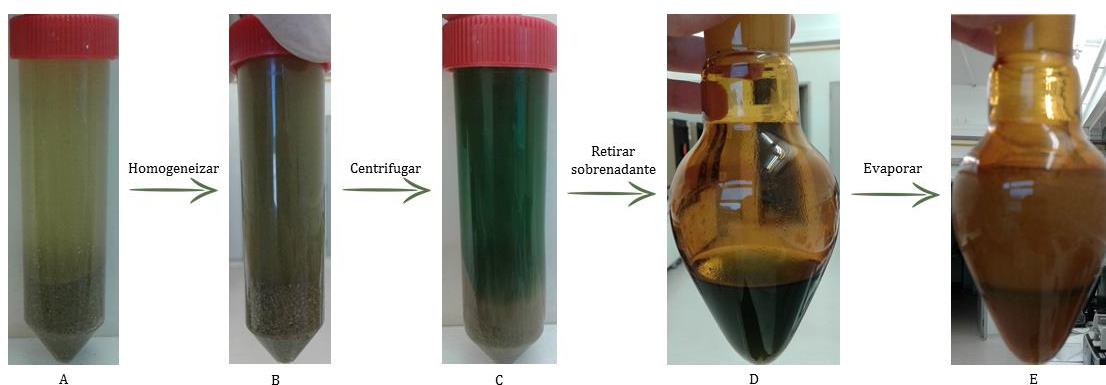
### 3.2.2. Equipamentos

Para a extração das plantas aromáticas utilizaram-se diversos equipamentos, entre eles, um moinho granulador Grindomix GM200 (Haan, Alemanha), uma balança analítica da marca Mettler Toledo XP205 Delta Range (Columbus, EUA) com  $\pm 0,01$  mg de precisão, um agitador compacto Edmund Bühler GmbH modelo KS-15 (Hechingen, Alemanha), uma centrífuga Eppendorf AG modelo 5804R (Hamburgo, Alemanha) e um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça).

### 3.2.3. Procedimento

O procedimento da extração encontra-se representado na Fig. 3.2.

Relativamente ao extrato de alecrim, a 5 g de cada amostra, adicionaram-se 50 ml de etanol absoluto (Fig. 3.2 A) e homogeneizou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos a 330 rpm (Fig. 3.2 B). A mistura foi depois centrifugada a 15 °C, durante 15 minutos a 11952 G (10000 rpm) (Fig. 3.2 C). Retirou-se o sobrenadante para um balão de evaporação (Fig. 3.2 D) e evaporou-se o etanol a 35 °C até à secura (Fig. 3.2 E). Com a ajuda de uma espátula, o extrato (Fig. 3.3) foi retirado do balão e armazenado.



**Fig. 3.2.** Procedimento de preparação do extrato de alecrim.

A – Alecrim triturado com etanol absoluto, prévia homogeneização; B – Alecrim triturado com etanol absoluto após homogeneização; C – Solução de alecrim após centrifugação; D – Sobrenadante da solução centrifugada; E – Extrato de alecrim após evaporação do etanol em evaporador rotativo.

Relativamente ao extrato de tomilho, o procedimento de extração aplicado foi semelhante, com alterações na utilização dos solventes. Para além do etanol, o tomilho foi extraído com recurso a mais dois solventes, a acetona e o metanol. O processo da extração do tomilho com estes dois solventes foi igual ao procedimento apresentado na Fig. 3.2, com a substituição do etanol pela acetona ou pelo metanol.

Realizou-se também uma extração do tomilho com etanol na qual as folhas de tomilho foram submetidas a uma secagem durante 48 horas a 100 mbar a 35 °C. Esta secagem teve o objetivo de eliminar a água residual das folhas de tomilho.



**Fig. 3.3.** Extrato de alecrim.

Os extratos secos foram embalados a vácuo, e colocados numa câmara frigorífica a 5 °C, protegidos da luz, antes da sua utilização, para evitar possíveis perdas de compostos ativos.

### **3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante *in vitro* dos Extratos de Plantas Aromáticas**

A determinação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos foi feita através dos ensaios do sistema de inibição do radical livre DPPH e do teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno. A capacidade antioxidante foi realizada com os extratos de alecrim e tomilho das três marcas, incluindo os extratos de tomilho extraídos com diferentes solventes e o obtido a partir de tomilho seco durante 48 horas e extraído com etanol (tomilho 48h).

### 3.3.1. Equipamentos

Para a determinação da capacidade antioxidante recorreu-se ao espectrofotómetro U-2000 da Hitachi, a uma balança analítica da marca Mettler Toledo XP205 Delta Range (Columbus, EUA) com  $\pm 0,01$  mg de precisão, um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça), um bloco de aquecimento QBD2 da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra) e um sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA).

### 3.3.2. Reagentes e Solventes

Utilizou-se etanol absoluto e clorofórmio da Merck (Darmstadt, Alemanha) e metanol de grau HPLC (J. T. Baker, EUA). O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, o  $\beta$ -caroteno, o Tween®40 e o ácido linoleico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

### 3.3.3. Sistema de inibição do radical livre DPPH

O método utilizado foi adaptado do método utilizado por Moure *et al.* (2001).

Primeiramente, procedeu-se à preparação das soluções metanólicas dos diferentes extratos de modo a que todos tivessem a mesma concentração (5 mg/ml). O método descrito por Moure *et al.* (2001) foi aplicado, com uma alteração no tempo de reação da amostra com o radical de 16 para 30 minutos. Uma solução metanólica de DPPH•, de concentração 14,2  $\mu$ g/ml foi preparada num balão âmbar. Ao abrigo da luz, fez-se reagir 50  $\mu$ l de amostra com 2 ml da solução metanólica de DPPH•. No caso dos controlos, utilizou-se 50  $\mu$ l do solvente usado na preparação do extrato. Mediu-se a absorvância ( $\lambda=515$  nm) no espectrofotómetro. A percentagem de inibição (IP%) do radical DPPH foi calculada pela equação 3.1:

$$IP (\%) = \frac{Ac - AA_{30}}{Ac} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que:

IP (%) - percentagem de inibição do radical DPPH;

Ac - a absorvância do controlo;

AA<sub>30</sub> - absorvância da amostra aos 30 minutos.

Depois de calculada a IP (%), foi avaliada a atividade antioxidante através do equivalente Trolox (ET). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) é um antioxidante sintético hidrossolúvel, semelhante à vitamina E, usado para

fazer comparações entre a capacidade antioxidante de uma dada substância com a capacidade antioxidante do Trolox. Esta comparação é denominada por atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC – do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Activity*) e é apresentada em µg ET/ml (Kuskosk *et al.* 2006). Para esta comparação foi preparada uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de Trolox.

### 3.3.4. Teste do Branqueamento do β-Caroteno

O método utilizado para este trabalho foi adaptado do método descrito por Miller (1971). Relativamente a este, o procedimento utilizado detém uma mudança no período de tempo a que as amostras ficam sujeitas à temperatura de 50 °C, passando de 3 para 2 horas (120 minutos). Resumidamente, dilui-se 2 mg de β-caroteno em 10 ml de clorofórmio. Num balão de evaporação, fez-se uma emulsão de 20 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween®40 e 1 ml da solução de β-caroteno em clorofórmio. Evaporou-se o clorofórmio a 40 °C a 100 mbar. Para completar a emulsão, adicionou-se 50 ml de água ultrapura, agitando-se a solução vigorosamente. Por fim, fizeram-se reagir 0,2 ml de amostra com 5 ml da emulsão de β-caroteno a 50 °C durante 2 horas. Para os ensaios de controlo utilizaram-se 0,2 ml de solvente. A absorvância dos ensaios controlo foi medida a 470 nm antes e depois de 2 horas de reação e a absorvância das amostras foi medida apenas no fim das 2 horas ao mesmo comprimento de onda. O Coeficiente da Atividade Antioxidante (AAC - do inglês *Antioxidant Activity Coefficient*) calculou-se pela equação 3.2.

$$AAC = \frac{AA\ 120 - Ac\ 120}{Ac\ 0 - Ac\ 120} \times 1000 \quad (3.2)$$

Em que:

*AA 120* - a absorvância da amostra aos 120 minutos de reação;

*Ac 120* - a absorvância dos ensaios de controlo aos 120 minutos de reação;

*Ac 0* - a absorvância dos ensaios de controlo no tempo inicial.

## 3.4. Seleção do extrato de plantas aromáticas a incorporar ao filme ativo

Após a determinação da capacidade antioxidante dos extratos individuais das plantas aromáticas, das três marcas selecionadas para o estudo, foram escolhidos os extratos individuais que obtiveram a melhor capacidade antioxidante pelos dois métodos para

realizar misturas. Tendo em conta que os componentes dos extratos de plantas aromáticas podem possuir comportamentos sinérgicos, efetuaram-se três misturas com os extratos das plantas individuais de acordo com a Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Misturas efetuadas com os dois extratos individuais que apresentaram melhor capacidade antioxidante.

Misturas	Extrato de Alecrim	Extrato de Tomilho
Mistura A	50 %	50 %
Mistura B	75 %	25 %
Mistura C	25 %	75 %

Para avaliar a capacidade antioxidante destas misturas realizaram-se os ensaios do sistema de inibição do radical livre DPPH e o teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, descritos nos pontos 3.2.1. e 3.2.2.

Posteriormente foi calculado o  $EC_{50}$  do extrato ou mistura escolhida, foram preparadas diversas diluições dos extratos (mg/ml) e calculadas as suas IP (%). Pelo Método dos Mínimos Quadrados, foi estabelecida uma equação linear através da qual se calculou o  $EC_{50}$  por interpolação (Cruz *et al.* 2007). Assim, através do método do radical DPPH, obtém-se a concentração necessária do extrato ou da mistura que inibe 50 % do radical DPPH (Cruz *et al.* 2005).

## 3.5. Determinação e Quantificação dos Compostos Fenólicos

Determinaram-se e quantificaram-se os ácidos rosmarínico e carnósico e o carnosol no extrato de alecrim.

### 3.5.1. Reagentes, Solventes e Padrões

Utilizou-se metanol de grau HPLC (J. T. Baker, EUA), acetonitrilo de grau HPLC da BDH Prolabo (Leuven, Bélgica) e ácido acético glacial da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões de ácido rosmarínico (CAS nº 2028-3-92-5), ácido carnósico (CAS nº 3650-09-7) e carnosol (CAS nº 5957-80-2) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

### 3.5.2. Equipamentos

Utilizou-se um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA), um banho ultrassónico Branson Bransonic 3510 (Dietzenbach, Alemanha) e um sistema de



filtração a vácuo com filtros de membrana de 0,22 µm (GH Polypro, Gelman Laboratory, Canadá). Para a determinação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos recorreu-se ao sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC® - do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatograph*), ACQUITY™ (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um DAD, uma bomba binária, um injetor automático e um sistema de termostato para a coluna. Pré-coluna utilizada foi a UPLC® BEH Shield RP18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula) (Waters, Milford, MA, EUA) e a coluna foi a ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula). Para o tratamento de dados recorreu-se ao software Empower™ versão 2.0 (Waters, Milford, MA, EUA).

### 3.5.3. Procedimento

Em relação ao método cromatográfico utilizado, este foi desenvolvido por Costa (2013). Prepararam-se duas fases móveis e posteriormente, foram filtradas com recurso a um sistema de filtração a vácuo e posteriormente desgaseificadas num banho ultrassónico durante 15 minutos à temperatura ambiente. As fases móveis utilizadas foram água ultrapura com 0,1 % (v/v) de ácido acético (Solvente A) e acetonitrilo com 0,1 % (v/v) de ácido acético (Solvente B). O volume de injeção foi de 10 µl, a temperatura da coluna foi de 20 °C e o fluxo da fase móvel foi de 0,5 ml/min. O gradiente de eluição utilizado está descrito na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Gradiente de eluição utilizado para análise cromatográfica do ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
6	78	22
20	60	40
29	25	75
30	90	10

Os padrões foram injetados nas concentrações de 60 µg/ ml cada e foram obtidas curvas de calibração. Posteriormente, foram preparadas e injetadas no cromatógrafo soluções metanólicas de 1 mg/ml dos extratos de alecrim das três marcas comerciais analisadas (marcas A, B e C) e o ácido rosmarínico, o carnosol e o ácido carnósico foram identificados por comparação do tempo de retenção e do espectro UV (obtido pelo detetor DAD no intervalo de 210 a 500 nm) das amostras com os padrões.

### **3.5.4. Análise da Atividade Antimicrobiana do Extrato**

As análises de avaliação da atividade antimicrobiana foram realizadas utilizando as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

A análise antimicrobiana do extrato de alecrim foi avaliada logo após a sua preparação (extrato fresco) e após 6 meses de conservação, embalado a vácuo, protegido da luz e à temperatura de 5 °C. Uma placa de Petri contendo *Plate Count Agar* (PCA) foi inundada com uma suspensão do microrganismo a estudar e após 5 minutos de contacto foi retirado o excesso de líquido da placa e a placa foi colocada a secar durante 10 minutos. De seguida, com um tubo estéril, fizeram-se duas cavidades com 4 mm de diâmetro no agar, onde posteriormente se colocaram os extratos. As placas foram colocadas numa estufa a 37 °C durante 24 horas em aerobiose, com exceção do *C. perfringens* que foi colocado em anaerobiose.

## **3.6. Desenvolvimento da Embalagem Ativa**

Os filmes ativos desenvolvidos foram preparados com um concentrado de proteína de soro de leite (WPC – do inglês *Whey Protein Concentrate*), água ultrapura, glicerol e extrato de plantas aromáticas.

### **3.6.1. Reagentes e Solventes**

Para o processo de otimização dos filmes ativos de proteína de soro de leite, utilizou-se WPC (80 %) (Glanbia Nutricionais, EUA), glicerol (Sigma-Aldrich, Alemanha) e extrato de plantas aromáticas (descrito no ponto 3.2).

### **3.6.2. Equipamentos**

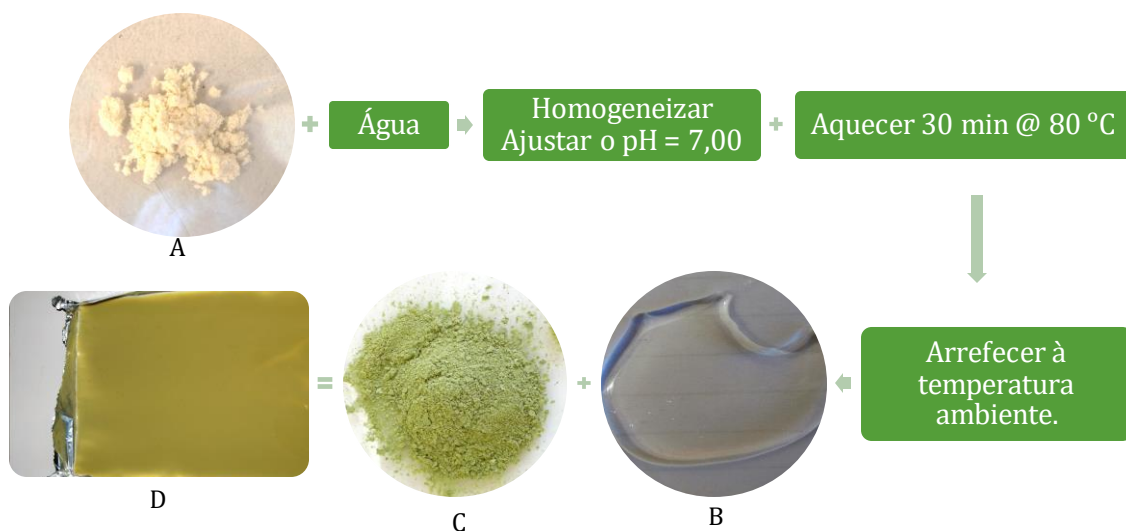
Recorreu-se ao homogeneizador Ultra-Turrax IKA® DI 25basic (Staufen, Alemanha), ao sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA), a um medidor de pH 780 Meter (Metrohm, Suíça) e ao banho termostático Memmert GmbH WB 14 (Hechingen, Alemanha).

### 3.6.3. Procedimento

O método de preparação do filme foi adaptado do método de Bahram *et al.* (2014). Primeiramente, testaram-se 3 percentagens de glicerol: 5 %, 10 % e 15 % (p/p). À WPC acrescentou-se água ultrapura e homogeneizou-se a solução a 9500 rpm durante 2 minutos. Neutralizou-se o pH da solução com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 M e submeteu-se a solução a um banho termostático a 80 °C durante 30 minutos. A solução foi arrefecida à temperatura ambiente. De seguida homogeneizou-se a solução com glicerol. A evaporação do solvente foi realizada à temperatura ambiente durante 48 horas numa superfície antiaderente de Teflon®.

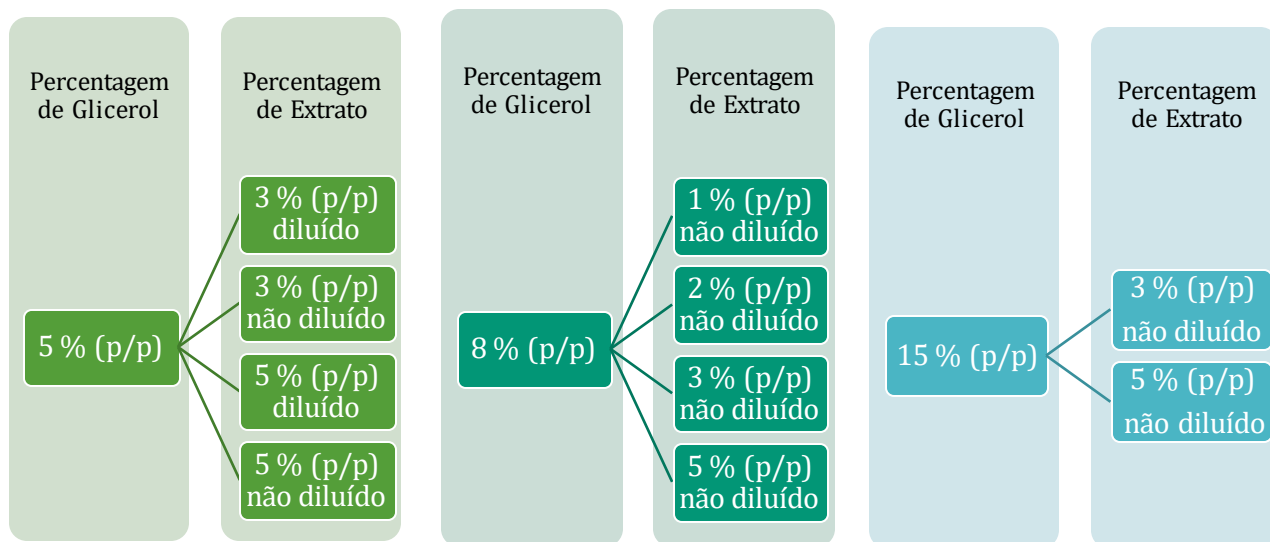
Seguidamente optimizou-se a percentagem de extrato incorporado no filme. Foram testadas as percentagens de 1, 2, 3 e 5 % de extrato (p/p). O procedimento foi igual ao procedimento utilizado nos testes de glicerol com a adição do extrato ao mesmo tempo do glicerol (Fig. 3.4).

Vários parâmetros e superfícies antiaderentes foram testados para a preparação dos filmes ativos. Os parâmetros encontram-se esquematizados nas Fig. 3.5 e 3.6. As superfícies de contacto escolhidas foram: Teflon®, papel vegetal, placas de Petri e papel de alumínio. A Fig. 3.7 apresenta uma foto do filme ativo após evaporação do solvente.

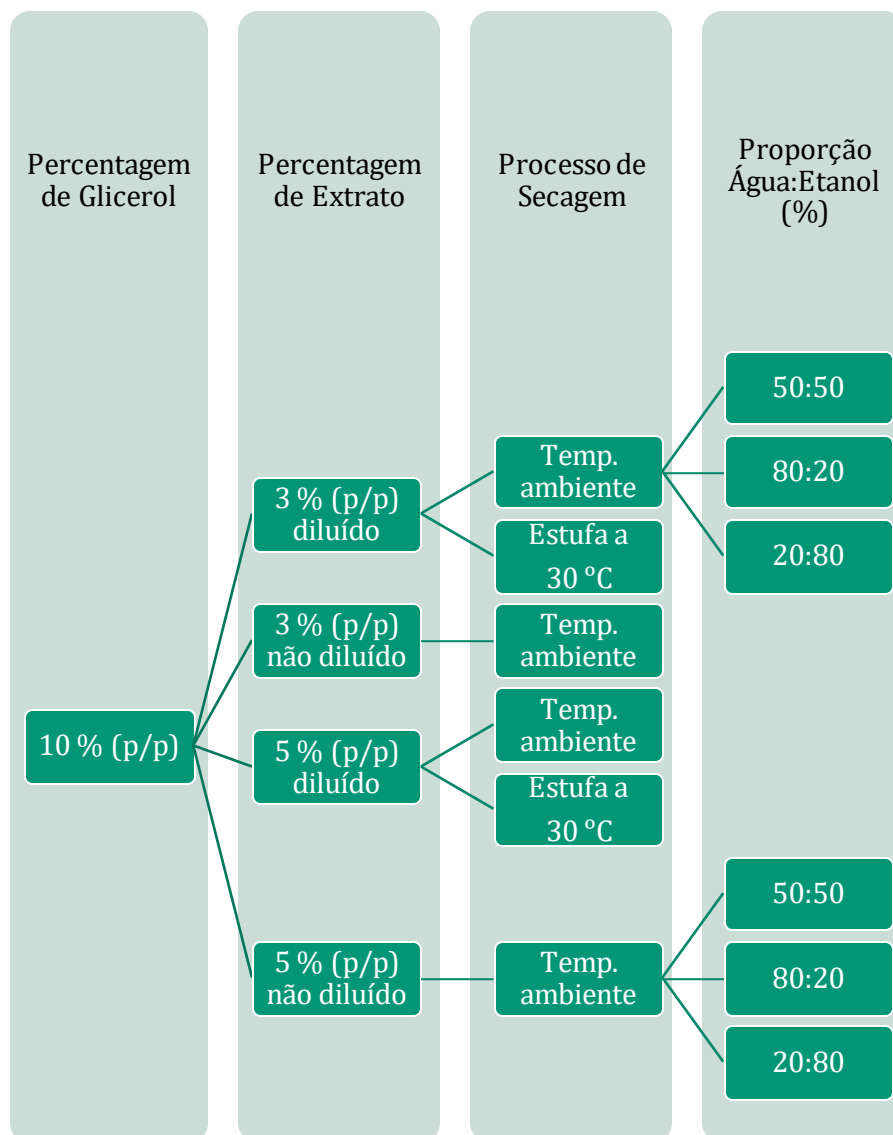


**Fig. 3.4.** Procedimento de preparação do filme ativo.

A – Proteína de soro de leite; B – Glicerol; C – Extrato; D – Filme em processo de secagem.



**Fig. 3.5.** Processo de otimização do filme com 5 % (p/p), 8 % (p/p) e 15 % (p/p) de glicerol.



**Fig. 3.6.** Processo de otimização do filme com 10 % (p/p) de glicerol.

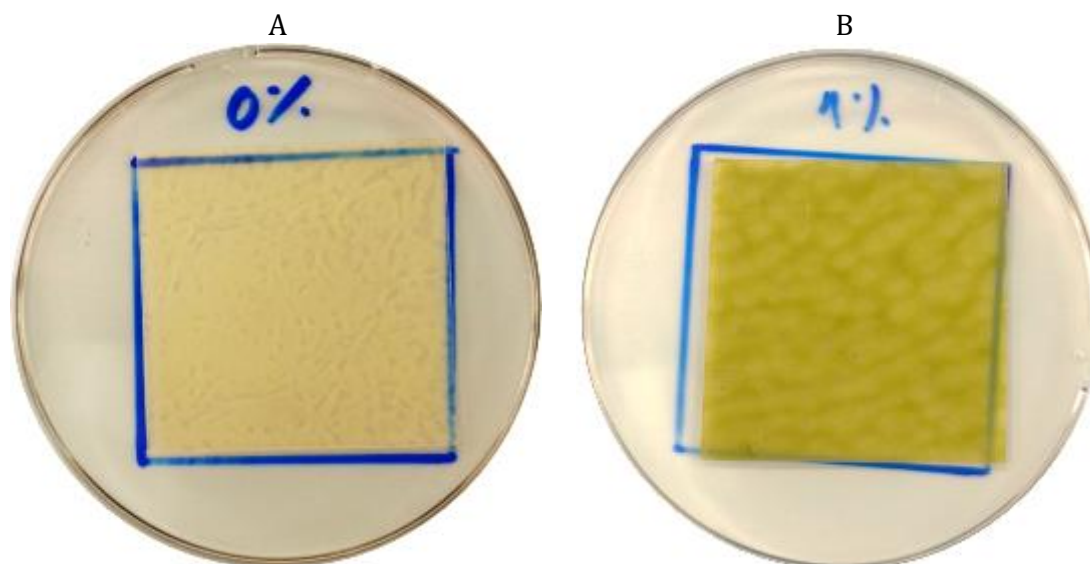


**Fig. 3.7.** Filme ativo após evaporação do solvente.

#### **3.6.4. Análise da Atividade Antimicrobiana do Filme Ativo**

As análises da atividade antimicrobiana foram realizadas com uma adaptação do método da norma ISSO 22196 (2011), utilizando as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.

Para análise da atividade antimicrobiana de cada microrganismo, foram recortados quadrados de 5 x 5 cm do filme controle (seis quadrados) e do filme ativo (três quadrados) para cada teste (Fig. 3.8). Cada filme foi colocado numa placa de Petri com a superfície que entra em contacto com o alimento voltada para cima. O inóculo de cada microrganismo, foi efetuado a partir de culturas em *stock* cultivadas em *Tryptone Soya agar* (TSA) e transferindo uma ansa de 1µl para *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e incubado a 37 °C. Realizaram-se diluições decimais sucessivas e da diluição  $10^{-4}$  foram aplicados 0,2 ml em cada filme. Para manter hidratado o microrganismo no filme, colocou-se por cima um quadrado de 4 x 4 cm de plástico estéril (*saco stomacher*). Três placas com o filme ativo e três placas com o filme controle foram incubadas durante 24 horas a  $35 \pm 1$  °C em atmosfera húmida em aerobiose (T24). Nas três placas de filme controle imediatamente após a inoculação (T0) foram colocados 10 ml de *Soybean Casein Lecithin Polysorbate* (SCDLP) que foi agitado durante 30 segundos. Da suspensão homogeneizada foram realizadas diluições sucessivas ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ). 1 ml do homogeneizado e das diluições foi colocado em placas de Petri estéreis nas quais se incorporou PCA previamente fundido e mantido a 45 °C. Após o meio solidificar, incubaram-se as placas a 35 °C durante 48 horas em aerobiose. No fim do período de incubação realizou-se a contagem de unidades formadoras de colónias. O mesmo procedimento foi aplicado às placas incubadas 24 horas após a inoculação (T24).



**Fig. 3.8.** Quadrados 5 x 5 cm do filme controlo (A) e do filme ativo (B).

### **3.7. Estudo da eficácia do filme ativo no controlo da oxidação lipídica de um alimento modelo**

#### **3.7.1. Amostras e Equipamentos**

Para testar a eficácia do filme ativo, o alimento modelo selecionado foi o salame adquirido, já fatiado, numa zona comercial de Lisboa. As fatias, aproximadamente com +/- 20 g cada, foram protegidas da luz e armazenadas à temperatura de - 20 °C, antes da sua análise. O salame foi o alimento escolhido para o desenvolvimento deste trabalho pelo seu alto teor lipídico. O salame escolhido tinha, por 100 g, de valor energético 352,7 kcal, de proteína 23,5 g, de lípidos totais 26,5 g, de hidratos de carbono 4,9 g e 3,9 g de sal. Era constituído por carne de porco, toucinho de porco, gelatina, leite em pó, xarope de glucose de milho, proteína de soja, especiarias e sal. Tinha ainda na sua constituição os conservantes E-250<sup>4</sup> e E-252<sup>5</sup>, o antioxidante E-316<sup>6</sup> e o corante E-120<sup>7</sup>.

---

<sup>4</sup> Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), usado como fixador de cor e conservante em carnes e peixes.

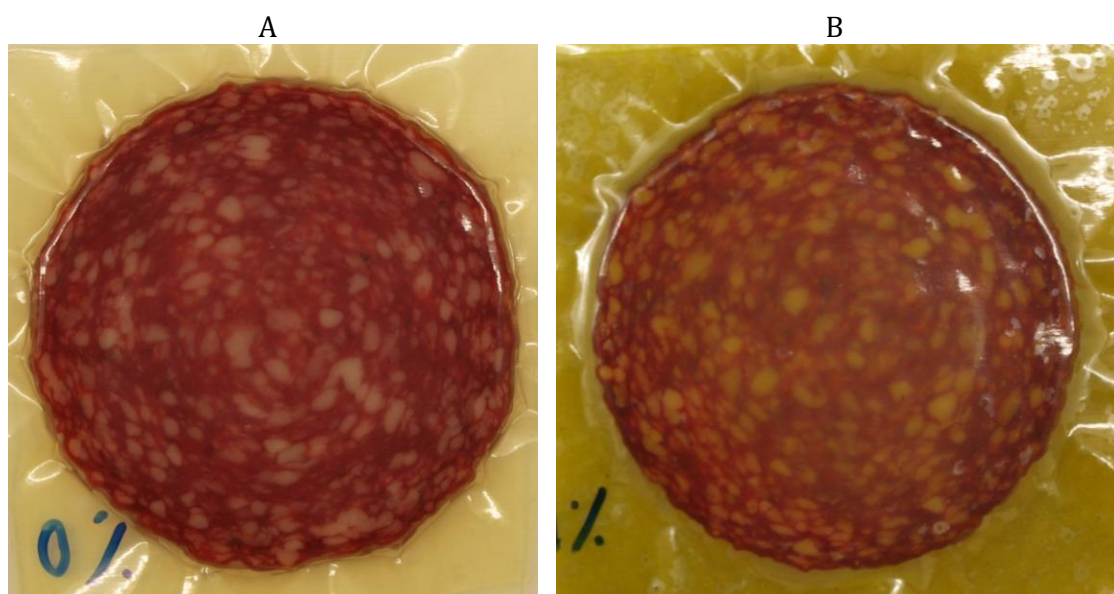
<sup>5</sup> Nitrato de Potássio ( $\text{KNO}_3$ ), usado em produtos cárneos de charcutaria para evitar a proliferação de *Clostridium botulinum*.

<sup>6</sup> Eritorbato de Sódio ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$ ), usado principalmente em carnes de aves e bebidas não alcoólicas. O seu uso em produtos de charcutaria deve-se à preservação da coloração rósea.

<sup>7</sup> Ácido carmínico ( $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ ) que pode ocorrer naturalmente em insetos como a cochonilha.

### 3.7.2. Procedimento

Ambas as faces de cada fatia de salame foram colocadas em contacto direto com o filme controlo (sem extrato) ou com o filme ativo de proteína de soro de leite. Posteriormente, cada fatia de salame foi colocada no interior de sacos de polietileno e estas foram embaladas a vácuo para permitir um ótimo contacto entre o filme e o alimento (Fig. 3.9). O alimento modelo esteve em contacto com o filme ativo durante diferentes tempos de armazenamento (0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias), ao abrigo da luz e à temperatura de 5 °C.



**Fig. 3.9.** Fatias de salame embaladas com o filme controlo (A) e o filme ativo com 1 % (p/p) de extrato de alecrim (B).

### 3.8. Ensaios para determinar o estado da oxidação lipídica de um alimento modelo

Após cada período de armazenamento, as fatias de salame foram analisadas para verificar a eficácia do filme ativo. Para tal efetuaram-se 4 ensaios para avaliar o estado de oxidação das fatias de salame: o Índice de Peróxidos, a determinação do valor de *p*-anisidina, o ensaio de TBARS e o ensaio da determinação do hexanal.

### 3.8.1. Amostras

Decorridos os períodos de armazenamento de cada ensaio (0, 7, 15, 30, 60 ou 90 dias), as fatias de salame foram trituradas separadamente com moinho granulador Grindomix GM200 (Haan, Alemanha) e conservadas separadamente ao abrigo da luz a -80 °C até análise.

### 3.8.2. Extração de Gordura

Para a realização do índice de peróxidos e para a determinação do valor de *p*-anisidina, foi necessário extrair a gordura das fatias de salame embaladas com o filme controle e o filme ativo.

#### 3.8.2.1. Reagentes, Solventes e Equipamentos

Para este ensaio utilizou-se éter de petróleo 40-60 °C de gradiente analítico da Fisher Scientific (Loughborough, Leics, UK), sulfato de sódio anidro de gradiente analítico da Merck (Darmstadt, Alemanha) e um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça).

#### 3.8.2.2. Procedimento

Durante 1 hora agitaram-se 10 g de amostra com 100 ml de éter de petróleo (Fig. 3.10). Filtrou-se a solução para um balão evaporador com um filtro Whatman n° 4 ao qual se adicionou uma colher de sulfato de sódio anidro, para reter a água da amostra. Evaporou-se o éter de petróleo a 40 °C. A gordura era conservada a 5 °C, protegida da luz, até realização do ensaio do índice de peróxidos e determinação do valor de *p*-anisidina.



**Fig. 3.10.** Extração da gordura do salame com éter de petróleo.



### 3.8.3. Índice de Peróxidos

O método utilizado para determinar o índice de peróxidos foi adaptado do método Cd8-53 descrito pela Sociedade Americana de Químicos de Óleos (AOCS, do inglês *American Oil Chemists' Society*) (AOCS 1989).

#### 3.8.3.1. Reagentes e Solventes

Utilizou-se iodeto de potássio da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), amido solúvel da Sigma-Aldrich Labochemikalien GmbH (Alemanha), isooctano e ácido acético glacial, ambos de gradiente analítico da Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### 3.8.3.2. Equipamentos

Utilizou-se o sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Belford, EUA) e um bloco de aquecimento da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra).

#### 3.8.3.3. Procedimento

Antes de começar este ensaio é necessário preparar três soluções: uma solução saturada de iodeto de potássio em água ultrapura, uma solução de cozimento de amido e uma solução de tiosulfato de sódio 0,01 N. Para preparar a segunda solução, dilui-se 0,5 g de amido em 10 ml de água ultrapura, aos quais se adicionam 40 ml de água ultrapura quente. Ferve-se a solução durante 3 minutos e arrefece-se rapidamente em gelo.

Adicionam-se 10 ml de isooctano, 15 ml de ácido acético e 1 ml da solução saturada de iodeto de potássio a 0,1 g de gordura (extraída no ponto 3.8.4). Agita-se a solução durante um minuto e conserva-se à temperatura ambiente protegida da luz durante 5 minutos. Adicionam-se 3 ml da solução de cozimento de amido e 75 ml de água ultrapura. Faz-se a titulação da solução com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, até a solução ficar de cor branca. Para o teste controlo, o procedimento é igual, mas é realizado sem a gordura. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

A determinação do índice de peróxidos (PV) é dada pela equação 3.3.

$$PV (meqO_2/kg \text{ gordura}) = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{m} \quad (3.3)$$

Em que:

*S* - volume de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto;

*B* - volume de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto nos ensaios de controlo;

*N* - normalidade do tiosulfato de sódio;

*m* - massa (g) da gordura.

### 3.8.4. Determinação do valor de *p*-anisidina

A determinação do valor de *p*-anisidina foi realizada de acordo com o British Standard method BS 684-2.24-1998 (British Standard Method 1998).

#### 3.8.4.1. Reagentes e Solventes

Para este ensaio utilizou-se *p*-anisidina da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), ácido acético glacial de gradiente analítico da Merck (Darmstadt, Alemanha) e *n*-hexano de gradiente para espectroscopia da BDH Prolabo (Leuven, Bélgica).

#### 3.8.4.2. Equipamentos

Utilizou-se o espectrofotómetro U-2000 da Hitachi e o banho ultrassónico Branson Bransonic 3510 (Dietznbach, Alemanha).

#### 3.8.4.3. Procedimento

Primeiro prepara-se a solução de *p*-anisidina, pesando 50 mg de *p*-anisidina para um balão de 20 ml e perfaz-se o volume com ácido acético.

A 0,5 g de gordura (extraída previamente no ponto 3.8.4), adicionam-se 25 ml de *n*-hexano e coloca-se a solução 5 a 10 minutos no banho ultrassónico à temperatura ambiente até a gordura se dissolver. Mede-se a absorvância da solução a 350 nm contra *n*-hexano. Adiciona-se 1 ml da solução de *p*-anisidina em ácido acético a 5 ml da solução da amostra. Conserva-se ao abrigo da luz durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para o teste controlo adiciona-se 1 ml da solução de *p*-anisidina a 5 ml de *n*-hexano. Por fim, mede-se a absorvância das amostras contra o teste controlo. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

O valor de *p*-anisidina é calculado segundo a equação 3.4.

$$AV = \frac{25 \times (1,2 Abs2 - Abs1)}{m} \quad (3.4)$$

Em que:

*AV* - valor da *p*-anisidina;

*Abs2* - absorvância da amostra depois dos 10 minutos de reação;

*Abs1* - absorvância inicial da amostra;

*m* - quantidade de gordura utilizada no ensaio (em g).

### **3.8.5. Ensaio de TBARS**

O método utilizado para a realização deste ensaio foi desenvolvido por Miller (1998).

#### **3.8.5.1. Reagentes e Solventes**

O ácido ortofosfórico e ao ácido tricloroacético utilizados eram ambos de grau analítico e foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha) e ao ácido tiobarbitúrico era proveniente da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

#### **3.8.5.2. Equipamentos**

Para a realização deste ensaio recorreu-se ao sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Belford, EUA), ao espectrofotómetro U-2000 da Hitachi, a um banho ultrassónico Branson Bransonic 3510 (Dietznbach, Alemanha), ao homogeneizador Ultra-Turrax IKA® DI 25basic (Staufen, Alemanha) e ao bloco de aquecimento QBD2 da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra).

#### **3.8.5.3. Procedimento**

Para a realização deste procedimento, preparam-se duas soluções: uma solução de ácido tricloroacético (TCA, do inglês *Trichloroacetic acid*) 10 % (m/v) em ácido ortofosfórico 0,02 M e uma solução aquosa de TBA.

Para a primeira, pesou-se 1,37 g de ácido ortofosfórico para um balão de 1000 ml, perfazendo-se o volume deste com água ultrapura. Para um balão de 100 ml, pesou-se 10 g de TCA e perfez-se o volume com a solução aquosa do ácido ortofosfórico (0,02 M).

Para a solução aquosa de TBA pesou-se 0,29 g para um balão de 100 ml e perfez-se o volume deste com água ultrapura. Para a total dissolução do TBA na água, levou-se a solução a um banho ultrassónico durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Pesaram-se 5 g de cada amostra (fatia de salame triturada e homogeneizada) para um copo de 100 ml, ao qual se adicionou 50 ml da solução de TCA. Homogeneizou-se a solução durante 1 minuto a 8000 rpm e filtrou-se (filtro Whatman nº 1) a solução para um balão de 50 ml. A 5 ml do filtrado adicionaram-se 5 ml da solução de TBA (para o teste controlo adicionaram-se 5 ml da solução de TBA a 5 ml de água ultrapura). De seguida, submeteram-se as amostras a 100 °C durante 40 minutos no bloco de aquecimento. No final dos 40 minutos, colocaram-se as amostras em banho de gelo durante 15 minutos para que arrefecem totalmente. Por fim, mediu-se a absorvância das amostras no espectrómetro a 530 nm, contra o teste controlo. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

### **3.8.6. Ensaio do Hexanal**

O método utilizado para a preparação da amostra foi desenvolvido por Wen *et al.* (1997) e o método para a identificação e quantificação do hexanal foi adaptado do método desenvolvido por Sanches-Silva *et al.* (2004).

#### **3.8.6.1. Reagentes e Solventes**

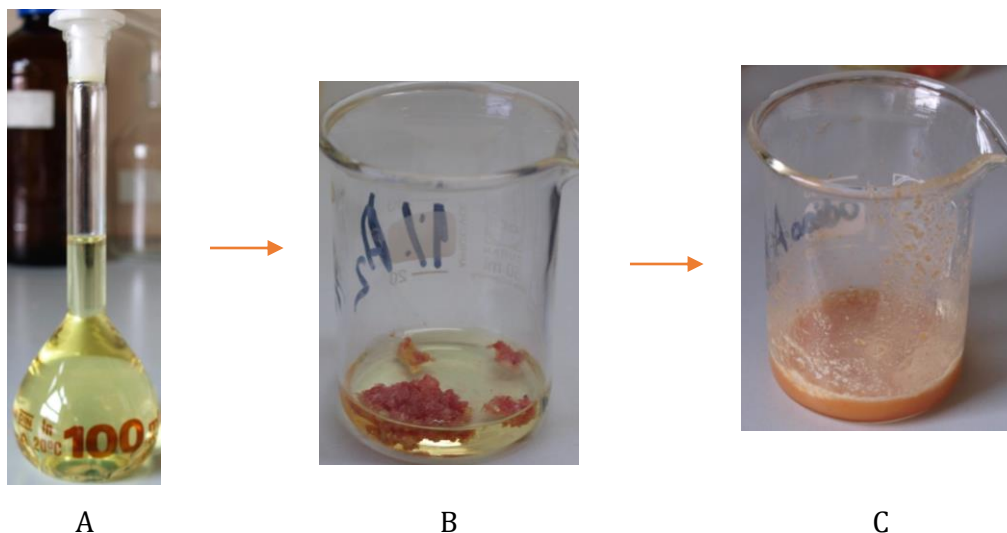
Utilizou-se 2,4-DNPH da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), *n*-hexano para espectroscopia da BDH Prolabo (Leuven, Bélgica) e o ácido sulfúrico e o metanol de grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### **3.8.6.2. Equipamentos e Material**

Para a realização deste ensaio recorreu-se a um homogeneizador Ultra-Turrax IKA® DI 25basic (Staufen, Alemanha), uma centrífuga Eppendorf AG modelo 5804R (Hamburgo, Alemanha), um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça), um sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Belford, EUA), a seringas Terumo® de 5 ml, a filtros de seringa PTFE (0,2 µm de tamanho de poro), viais cor âmbar 12 x 32 mm da Cronus (Maisemore Gloucester, UK), um banho ultrassónico Branson Bransonic 3510 (Dietzenbach, Alemanha), a um sistema de filtração a vácuo com filtros de membrana com 0,22 µm de tamanho de poro (GH Polypro, Gelman Laboratory, Canadá), a um sistema cromatográfico UPLC® ACQUITY™ da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com um DAD, uma bomba binária, um amostrador automático e um sistema de termostato para a coluna. A pré-coluna utilizada foi uma ACQUITY™ UPLC® BEH C18 (2,1 x 5,0 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula) e a coluna analítica foi uma ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm de tamanho de partícula).

#### **3.8.6.3. Procedimento**

Para a realização deste ensaio foi preparada uma solução de 2,4-DNPH. Para esta solução pesou-se 0,17 g de 2,4-DNPH num balão de 100 ml e fez-se o volume com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 30 % (v/v) (Fig. 3.11. A).



**Fig. 3.11.** Esquema do ensaio para a determinação do hexanal por UPLC®-DAD.

A – Solução de 2,4 DNPH; B – Salame triturado com 5 ml da solução de 2,4 DNPH; C – Salame com a solução de 2,4-DNPH após homogeneização.

Para a extração do hexanal, pesou-se 1 g do salame para um copo de 50 ml. Adicionaram-se 5 ml da solução de 2,4-DNPH (Fig. 3.11. B) e homogeneizou-se a solução a 8000 rpm durante 2 minutos, à temperatura ambiente (Fig. 3.11. C). A solução foi mantida durante 4 horas, protegida da luz, à temperatura ambiente.

Decorrido este período de tempo, adicionaram-se 10 ml de *n*-hexano e centrifugou-se a solução a 1914 G (4000 rpm) durante 10 minutos, à temperatura de 15 °C. Retirou-se o resíduo sobrenadante para um balão evaporador e repete-se o processo duas vezes. Seguidamente, evaporou-se o *n*-hexano a 35 °C e redissolve-se o resíduo em 10 ml de metanol. Após filtração, a solução foi analisada no sistema UPLC®-DAD.

Relativamente ao método cromatográfico utilizado para identificar e quantificar o hexanal, as fases móveis utilizadas foram água ultrapura (Solvente A) e acetonitrilo (Solvente B) na proporção 25:75, em modo isocrático. As duas fases móveis foram filtradas e desgaseificadas por 15 minutos. Neste método cromatográfico, a coluna foi mantida a 20 °C, o fluxo da fase móvel foi de 0,5 ml/min e o volume de injeção foi de 10 µl. O hexanal foi identificado e quantificado a 365 nm, e o tempo de retenção foi de  $0,95 \pm 0,1$  min. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

### 3.9. Análise Sensorial

Para melhor analisar o efeito da nova embalagem ativa sobre o alimento modelo embalado, foi realizada uma análise sensorial. Para eleger um painel de provadores foi disponibilizado um questionário *online* para consumidores e alunos e trabalhadores de

restauração. O questionário incluiu questões sociodemográficas e os requisitos de participação no painel de provadores. O questionário completo encontra-se no Anexo I.

Foram realizadas três provas sensoriais na Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril. A primeira prova consistiu na explicação do projeto e na prova e na avaliação de fatias de salame adquiridas no próprio dia. Na primeira prova foram escolhidos em painel os descritores avaliados nas provas seguintes. O painel utilizou uma escala de intensidade de 1 a 5, em que 1 era utilizado para a intensidade mais fraca e o 5 para a intensidade mais forte. Nesta sessão foram definidos 15 descritores (Tabela 3.3), para analisar as amostras nas sessões seguintes.

**Tabela 3.3.** Descritores selecionados para a avaliação descritiva das amostras.

Sabor	Textura	Outros
Salgado	Gordurosa	Cor Vermelha
Fumo	Fibrosa	Odor Típico
Estranho	Suculência	Aroma Típico
Ácido	Maciez	Aspetto Apelativo
Amargo	-	-
Picante	-	-
Paprica	-	-

Na segunda e na terceira sessões (intervaladas por uma semana) foi avaliado o salame após o contato com a embalagem ativa e controlo. Foram testadas as fatias em contacto, durante 30 e 90 dias, com o filme controlo e com o filme ativo. O painel provou as amostras com e sem embalagem, tal como se encontra ilustrado na Fig. 3.12.



**Fig. 3.12.** Apresentação das amostras ao painel de provadores da análise sensorial.

Às amostras foram dados códigos aleatórios para que o painel de provadores não fosse influenciado por qualquer nome. Na Tabela 3.4 encontra-se a decodificação do código.

**Tabela 3.4.** Decodificação das amostras em estudo.

<b>Código</b>	<b>Descrição da Amostra</b>
<b>317</b>	Fatia embalada por 30 dias com o filme controlo – avaliação sem embalagem.
<b>137</b>	Fatia embalada por 30 dias com o filme controlo – avaliação com embalagem.
<b>491</b>	Fatia embalada por 30 dias com o filme ativo – avaliação sem embalagem.
<b>798</b>	Fatia embalada por 30 dias com o filme ativo – avaliação sem embalagem.
<b>351</b>	Fatia embalada por 90 dias com o filme controlo – avaliação sem embalagem.
<b>563</b>	Fatia embalada por 90 dias com o filme controlo – avaliação com embalagem.
<b>846</b>	Fatia embalada por 90 dias com o filme ativo – avaliação sem embalagem.
<b>782</b>	Fatia embalada por 90 dias com o filme ativo – avaliação com embalagem.

### **3.10. Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de análises de variância (ANOVA) e, em caso da existência de diferenças significativas, utilizou-se o Teste Tukey. Considerou-se que existem diferenças significativas quando o valor  $p$  é maior ou igual a 0,05.

Todos os testes estatísticos foram realizados com recurso ao *software* Microsoft Office Excel (2016).

## Resultados e Discussão

### 4.1. Atividade Antioxidante

#### 4.1.1. Capacidade Antioxidante *in vitro* dos Extratos

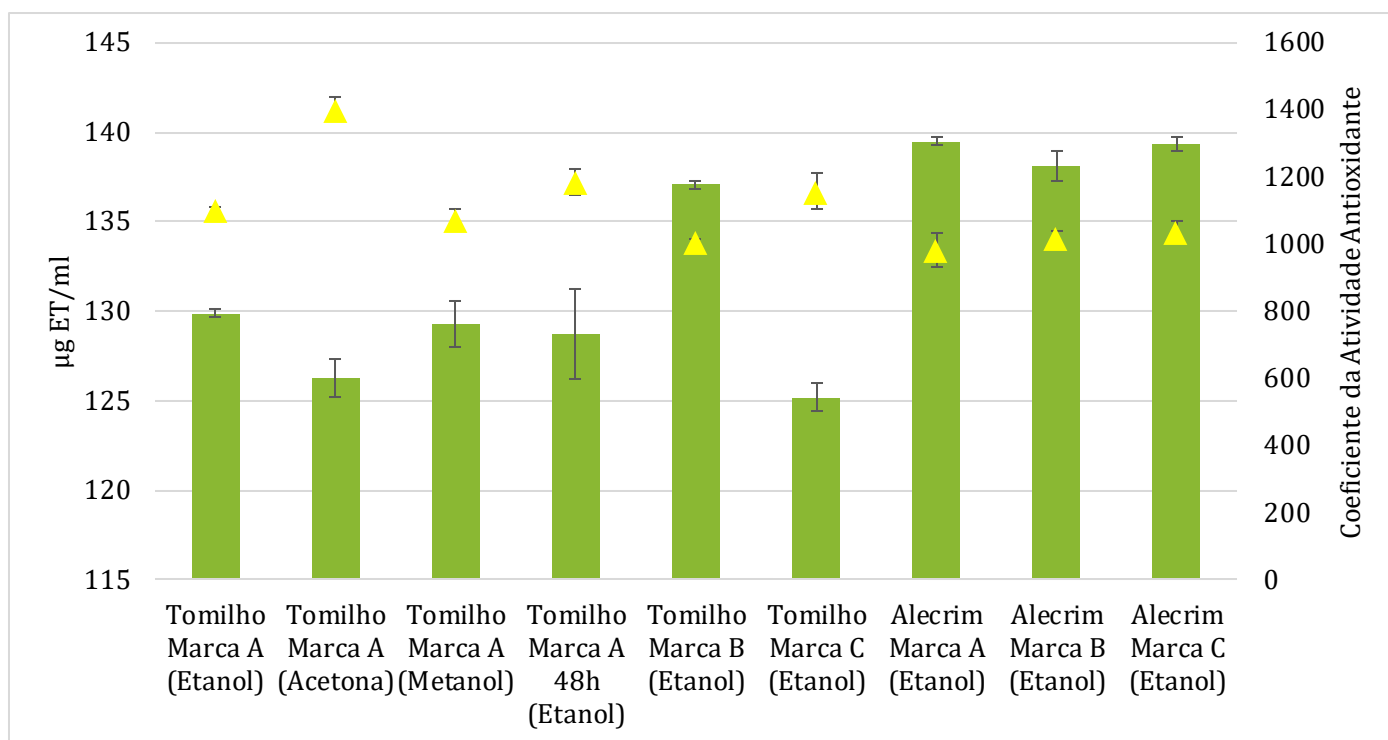
A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de alecrim e de tomilho, provenientes de três marcas comerciais e extraídos com diferentes solventes foi primeiramente avaliada através do ensaio do sistema de inibição do DPPH• e posteriormente com o teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno.

Após a determinação das percentagens de inibição dos extratos, foram calculados os equivalentes Trolox (ET) para cada extrato (Fig. 4.1). O extrato de tomilho que apresentou maior capacidade antioxidante foi o extrato proveniente da marca comercial B. No que diz respeito aos extratos de alecrim, os extratos com maior capacidade antioxidante foram os da marca A e da marca C.

No que diz respeito ao ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (Fig. 4.1), o extrato de tomilho da marca comercial A extraído com acetona foi o extrato com maior capacidade antioxidante, contrariando os resultados do ensaio do DPPH•. Relativamente aos extratos de alecrim, o que apresentou melhor resultado face ao ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno foi o extrato proveniente da marca comercial C.

Os valores obtidos para os extratos de alecrim das três marcas comerciais são bastante próximos, o que não se verifica para os extratos de tomilho, mesmo quando se considera o mesmo solvente de extração (Fig. 4.1).





**Fig. 4.1.** Gráfico de comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH• (colunas) e do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (triângulos).

Em ambos os ensaios, os extratos de tomilho provenientes da marca A extraídos com etanol e metanol apresentaram valores semelhantes. No ensaio do DPPH•, O extrato acetônico de tomilho da marca A foi o que apresentou melhor capacidade antioxidante pelo teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, no entanto o mesmo não se verificou no ensaio do radical DPPH, no qual foi umas das amostras que apresentou menor capacidade antioxidante, contrariando os resultados obtidos pelo teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno. Segundo a tabela de composição de alimentos dos EUA (United States Department of Agriculture 2016), 7,8 % do tomilho seco contém água. Por este motivo, realizou-se uma nova secagem a esta amostra para verificar se a água residual existente na mesma poderia interferir na capacidade antioxidante do tomilho. Pelos resultados obtidos, os valores obtidos pelo ensaio do DPPH• para os extratos etanólicos de tomilho, com e sem secagem, diferem consideravelmente. O mesmo acontece para o teste do  $\beta$ -caroteno, embora o extrato de tomilho que passou pelo processo de secagem apresente um valor ligeiramente maior do que o extrato que não passou pelo processo de secagem.

Os dois extratos que apresentaram melhor capacidade antioxidante foram selecionados para serem aplicados em três misturas a fim de estudar o efeito sinérgico dos componentes ativos.

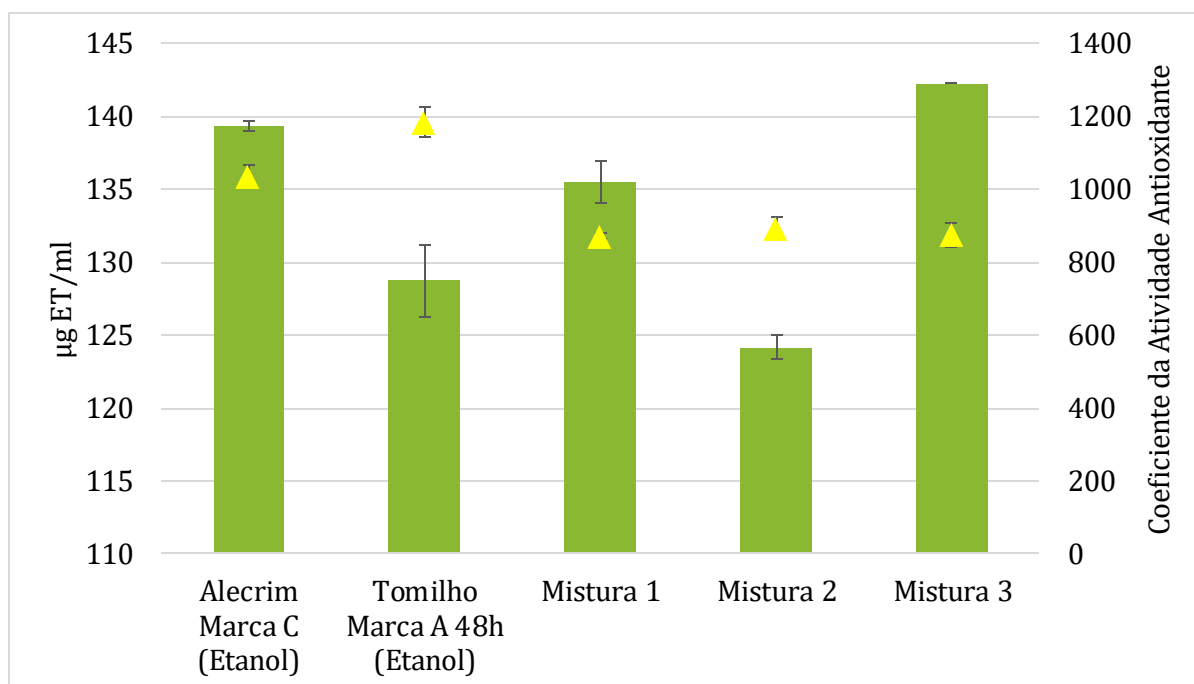
Os principais critérios para a escolha destes extratos para além da obtenção de maior capacidade antioxidante foram a baixa toxicidade do solvente de extração e a coerência de resultados entre os dois testes de capacidade antioxidante.

Comparando os dois ensaios, o extrato de alecrim escolhido foi o extraído das folhas de alecrim pertencentes à marca comercial C. Relativamente ao extrato de tomilho, o escolhido foi o extrato pertencente à marca comercial A sujeito a um processo de secagem durante 48 horas prévio à extração. Uma vez que os valores obtidos para os extratos de tomilho de etanol e metanol foram muito similares, o extrato de metanol não foi considerado dado o caráter tóxico do solvente.

Foram testadas 3 misturas com os extratos selecionados: a mistura 1 composta por partes iguais dos dois extratos, a mistura 2 composta por 75 % do extrato de tomilho e 25 % do extrato de alecrim, e a mistura 3 composta por 25 % do extrato de tomilho e 75 % do extrato de alecrim.

Entre as misturas (Fig. 4.2), no ensaio do radical DPPH, a mistura 3 foi a que obteve melhor capacidade antioxidante (142,3 µg ET/ml) e a mistura 2 a que obteve o valor mais baixo (124,17 µg ET/ml). A mistura 1, composta por partes iguais dos dois extratos, apresentou um valor aproximadamente médio (135, 6 µg ET/ml) entre as misturas e entre os valores dos dois extratos individuais escolhidos.

No que diz respeito ao teste do β-caroteno (Fig.4.2), a mistura 2 foi a que apresentou o melhor coeficiente de atividade antioxidante (896, 4), seguida pela mistura 3 (875,3) e pela mistura 1 (871,27) que apresentaram valores muito próximos.



**Fig. 4.2.** Comparação dos resultados dos ensaios do DPPH• (colunas) e do  $\beta$ -caroteno (triângulos) das misturas e dos extratos escolhidos. Mistura 1 – 50 % de extrato de alecrim e 50 % de extrato de tomilho; Mistura 2 – 75 % de extrato de tomilho e 25 % de extrato de alecrim; Mistura 3 – 25 % de extrato de tomilho e 75 % de extrato de alecrim.

Comparando com os valores individuais dos extratos escolhidos, os valores obtidos em ambos os ensaios para a mistura 2 foram inferiores. Sendo esta a mistura que apresenta a maior percentagem de extrato de tomilho, os componentes ativos do tomilho apresentaram um efeito antagonista.

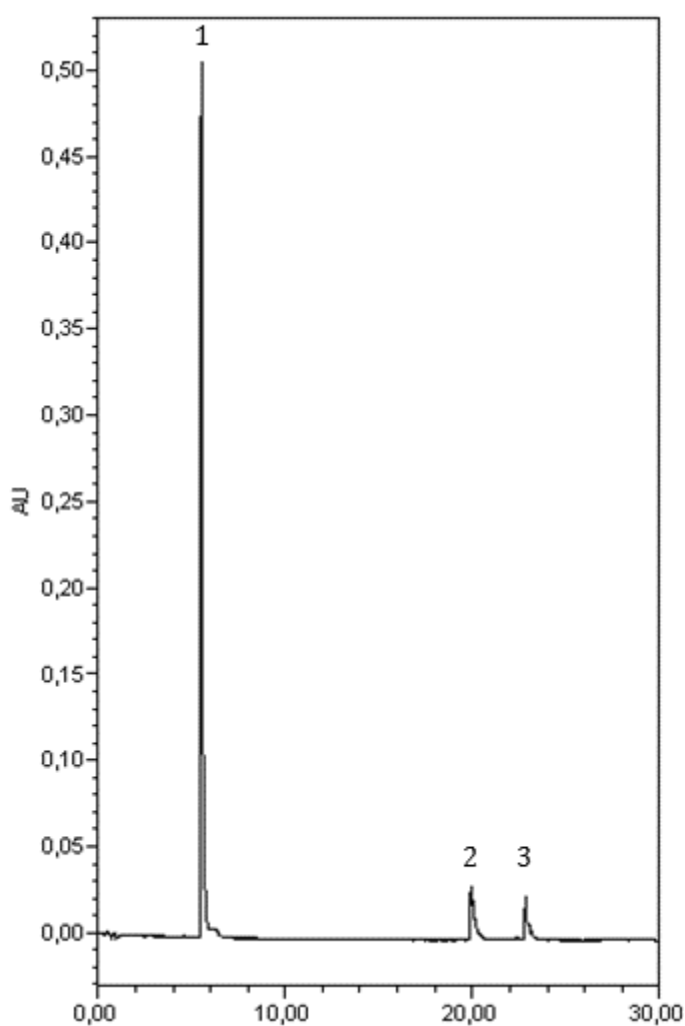
Pelo ensaio do radical DPPH, a mistura 3 apresentou melhor capacidade antioxidante do que os extratos escolhidos, ou seja, apresenta um efeito sinérgico entre os compostos de ambos os extratos.

No entanto, pelo teste do  $\beta$ -caroteno, as três misturas apresentam uma capacidade antioxidante inferior a capacidade apresentada pelos extratos individuais. Assim sendo o extrato de alecrim foi o que apresentou maior coerência de resultados nos dois testes, tendo sido escolhido para ser incorporado nos filmes à base de proteína de soro de leite. Procedeu-se posteriormente ao cálculo do  $EC_{50}$  do extrato de alecrim, pelo sistema de inibição do radical DPPH.

O  $EC_{50}$  do extrato de alecrim escolhido foi de 0,38 mg/ml. Comparando com outros autores, este valor foi similar ao valor encontrado por Reis (2014) (0,37 mg/ml) para um extrato etanólico de alecrim. O valor do  $EC_{50}$  encontrado por Babovic *et al.* (2010) para um extrato de alecrim obtido através da extração supercrítica de dióxido de carbono foi de 0,23 mg/ml. A diferença dos valores pode ser explicada pelo uso de diferentes solventes ou métodos de extração.

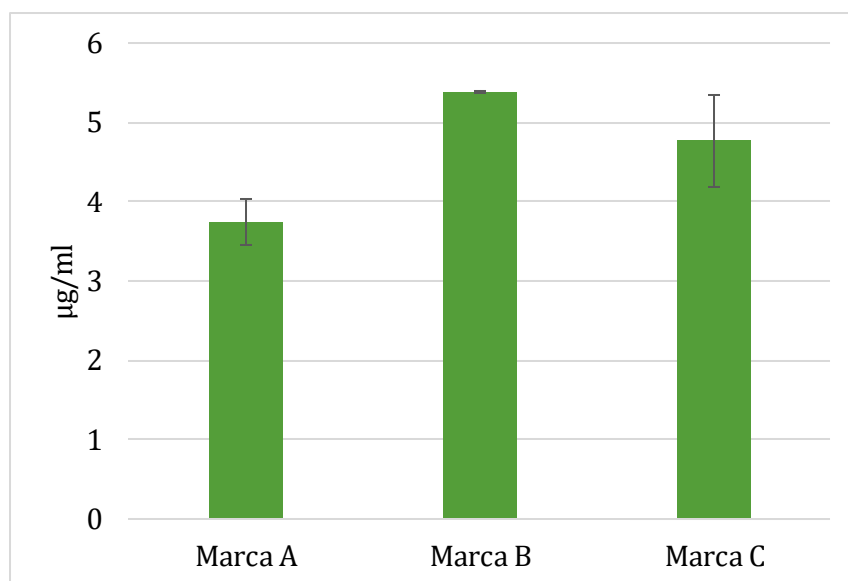
## 4.2. Quantificação de Compostos Fenólicos por UPLC-DAD em extratos de alecrim

A quantificação de compostos fenólicos realizou-se somente no extrato escolhido para posterior incorporação no filme proteico. Fez-se a determinação e quantificação de três compostos fenólicos: ácido rosmarínico, o carnosol e o ácido carnósico. A determinação foi feita por comparação com o cromatograma obtido para os padrões (Fig. 4.3).



**Fig. 4.3.** Cromatograma dos padrões de ácido rosmarínico (1), carnosol (2) e ácido carnósico (3).

O extrato de alecrim que apresentou conteúdo em ácido rosmarínico (Fig. 4.4) foi o da marca comercial B (5,39 µg/ml), seguido do extrato da marca C (4,78 µg/ml) e do extrato da marca A (3,74 µg/ml).



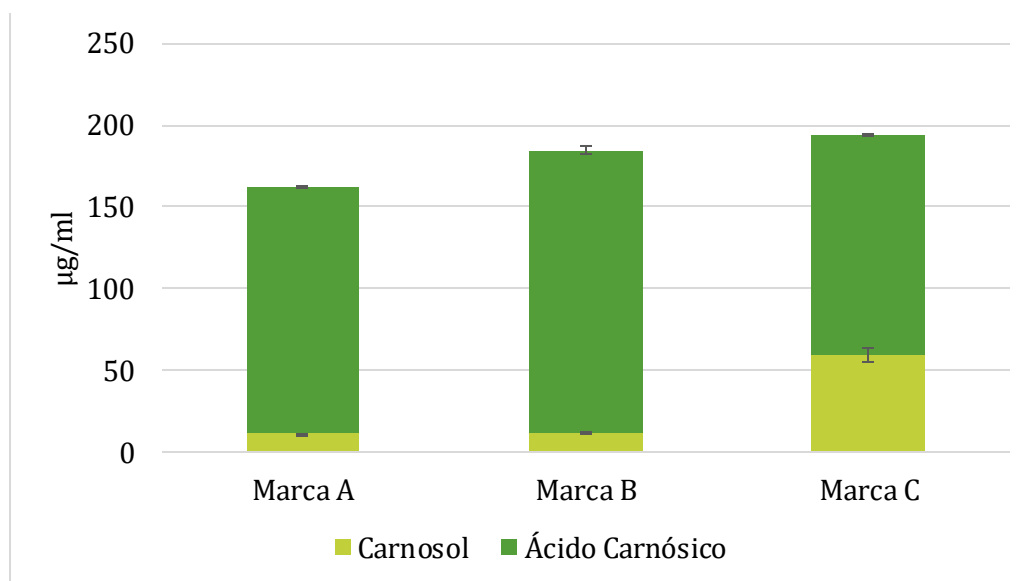
**Fig. 4.4.** Conteúdo em ácido rosmarínico dos extratos obtidos a partir das 3 marcas comerciais de alecrim seco.

Outros autores também determinaram o conteúdo de ácido rosmarínico em extratos de alecrim. Hernández-Hernández *et al.* (2009) quantificou o ácido rosmarínico em extratos de alecrim obtidos com etanol e com clorofórmio. Estes autores também analisaram o conteúdo de ácido rosmarínico numa mistura dos dois extratos. No extrato de alecrim obtido com clorofórmio (0,00135 mg/mg) e na mistura dos extratos (0,0013 mg/mg), o conteúdo de ácido rosmarínico foi muito menor que no extrato etanólico (0,0395 mg/mg) (Hernández-Hernández *et al.* 2009). Em comparação com os resultados encontrados neste trabalho, o extrato etanólico desenvolvido por Hernández-Hernández *et al.* (2009) obteve um menor conteúdo de ácido rosmarinico. Esta diferença pode ser explicada pela diferença na amostra (alecrim fresco/alecrim seco) e nos métodos de extração, uma vez que os autores maceraram folhas frescas de alecrim com etanol, o que não sucedeu no método de extração utilizado para este trabalho.

Wang *et al.* (2004) também quantificou o ácido rosmarinico num extrato etanólico de alecrim. Os autores conseguiram encontrar 10 mg/g de ácido rosmarinico, valor superior aos valores encontrados no extrato desenvolvido neste trabalho. Esta diferença pode ser mais uma vez explicada pela diferença no método de extração (Wang *et al.* 2004).

Relativamente ao ácido carnósico (Fig. 4.5), o extrato que apresentou a maior quantidade foi o extrato proveniente da marca B (172,33 µg/ml), seguido pelo extrato da marca A (150,95 µg/ml) e da marca C (134,65 µg/ml). O conteúdo de carnosol nos três extratos também está representado na Fig.4.5, uma vez que este composto fenólico é um composto derivado do ácido carnósico. O extrato proveniente da marca comercial C é o que

apresenta maior conteúdo em carnosol (59,68 µg/ml), seguido do extrato da marca B (12,31 µg/ml) e da marca A (11,51 µg/ml).



**Fig. 4.5.** Conteúdo em ácido carnósico e carnosol dos extratos etanólicos obtidos a partir das 3 marcas comerciais de alecrim seco.

O extrato de alecrim proveniente da marca comercial C apresenta o maior conteúdo da soma do ácido carnósico com o carnosol (Fig. 4.5).

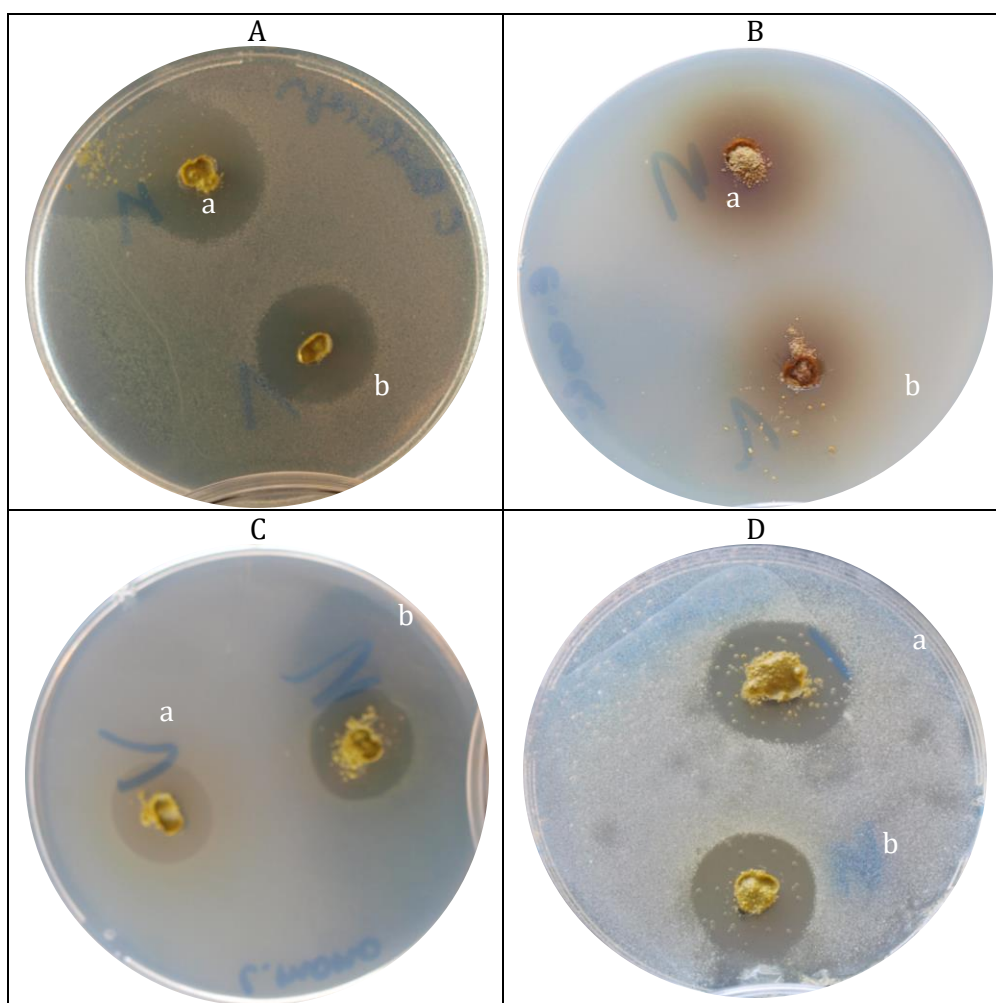
Hernández-Hernández *et al.* (2009) quantificaram também o conteúdo do ácido carnósico e do carnosol em extratos de alecrim extraídos com recurso a clorofórmio, etanol e uma mistura dos dois extratos. O extrato de alecrim extraído com clorofórmio apresentou uma maior concentração de ácido carnósico (0,4388 mg/mg) que o valor mais alto encontrado neste trabalho (0,1723 mg/mg), o que também se verificou para o extrato de alecrim conseguido a partir dos dois solventes (0,3468 mg/mg). No entanto, o extrato etanólico de alecrim apresentou uma concentração de ácido carnósico muito inferior (0,00485 mg/mg) aos valores encontrados para os extratos de alecrim deste trabalho. Relativamente carnosol, o extrato etanólico de alecrim de Hernández-Hernández *et al.* (2009) apresentou uma concentração inferior mas próxima (0,0548 mg/mg) à do extrato de alecrim da marca C (0,0597 mg/mg) (Hernández-Hernández *et al.* 2009).

Noutro estudo realizado por Amaral *et al.* (2013), o ácido carnósico foi quantificado num extrato etanólico de alecrim. A concentração reportada (26,4 mg/g) neste estudo foi muito inferior às concentrações encontradas no presente trabalho (134,65-172,33 mg/g) (Amaral *et al.* 2013).

Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso de métodos de extração distintos, nomeadamente no que respeita aos solventes de extração.

### 4.3. Capacidade Antimicrobiana do Extrato

Nas placas de Petri inoculadas com os diferentes microrganismos, Fig. 4.6, pode-se observar que ambos os extratos, com 6 meses (a) e logo após a sua preparação (b), apresentaram capacidade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, com a exceção da *E. coli* (Fig. 4.6 B). Na Fig. 4.6. (A, C e D) verifica-se que ambos os extratos apresentam um halo de inibição contra o *Clostridium perfringens*, a *Listeria monocytogenes* e o *Staphylococcus aureus*.



**Fig. 4.6.** Resultados dos testes de inibição do extrato com 6 meses (a) e do extrato fresco (b). A - *Clostridium perfringens*; B - *Escherichia coli*; C - *Listeria monocytogenes*; D - *Staphylococcus aureus*.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Rozman e Jersek (2009). Os autores testaram dois extratos comerciais de alecrim com diferentes níveis de ácido carnósico e concluíram que ambos os extratos possuíam uma boa capacidade inibitória contra a *Listeria monocytogenes*. Os autores também verificaram que, apesar de ser mínima, existia uma diferença na capacidade de inibição entre os dois

extratos, explicada pela quantidade de ácido carnósico (Rozman e Jersek 2009). Bubonja-Sonje e os seus colegas (2011) também verificaram a capacidade antimicrobiana de um extrato de alecrim comercial contra *Listeria monocytogenes*, indicando o potencial do uso do extrato de alecrim como aditivo alimentar, de forma a prevenir a deterioração dos alimentos causada por microrganismos (Bubonja-Sonje *et al.* 2011).

A capacidade de inibição de extratos de alecrim contra *Staphylococcus aureus* também foi descrita no trabalho desenvolvido por Abu-shanab e Adwan (2004). Os autores testaram a capacidade antimicrobiana de extratos etanólicos e metanólicos de alecrim (Abu-shanab e Adwan 2004). Erdogrul (2002) também descreveu a capacidade antimicrobiana de extratos de alecrim obtidos com recurso a diferentes solventes: acetato de etilo, clorofórmio, acetona e metanol. Destes, o extrato de acetato de etilo apresentou os melhores resultados contra o *Staphylococcus aureus* (Erdogrul 2002).

## **4.4. Desenvolvimento da Embalagem Ativa**

### **4.4.1. Efeito do Glicerol**

O glicerol é um dos plastificantes mais utilizados e, sendo uma molécula de baixo peso molecular e de natureza hidrofílica, a sua incorporação em matrizes proteicas é mais fácil, tornando os filmes mais flexíveis, extensíveis e resistentes (Hernandez-Izquierdo e Krochta 2008; Kowalczyk e Baraniak 2011).

Prévia à incorporação do extrato no filme, estabeleceram-se as percentagens de glicerol que deveriam ser testadas. Foram incorporadas três percentagens de glicerol (5, 10 e 15 %, p/p) na mistura aquosa de WPC, pelo método descrito no ponto 3.6.

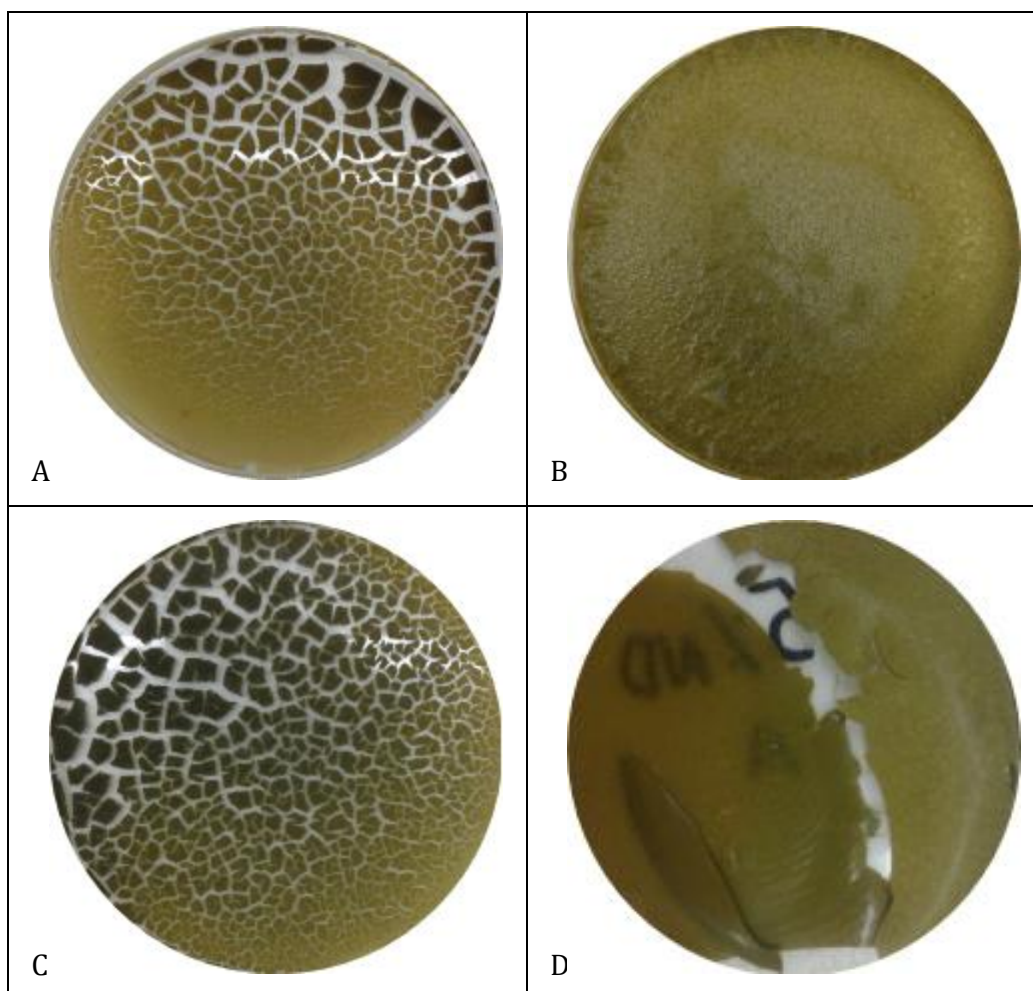
Das três percentagens testadas, o filme com a maior % de glicerol (15 %) não se conseguiu separar da superfície de Teflon®. Os filmes contendo as percentagens de 5 e 10 % conseguiram-se separar da superfície de Teflon® e apresentaram boa maleabilidade e consistência, sendo o filme com 5% de glicerol o que apresentou melhores resultados. Da bibliografia encontrada é praticamente inexistente a informação relativamente à otimização do conteúdo de glicerol em filmes proteicos.

### **4.4.2. Otimização da incorporação de Extrato**

Após a otimização da % de glicerol a incorporar ao filme, testou-se a incorporação de extrato em percentagens diferentes, e diluído (num solvente) e não diluído (sob a forma de pó) (Fig. 4.6). As percentagens de extrato de alecrim testadas inicialmente foram 3 e 5 %



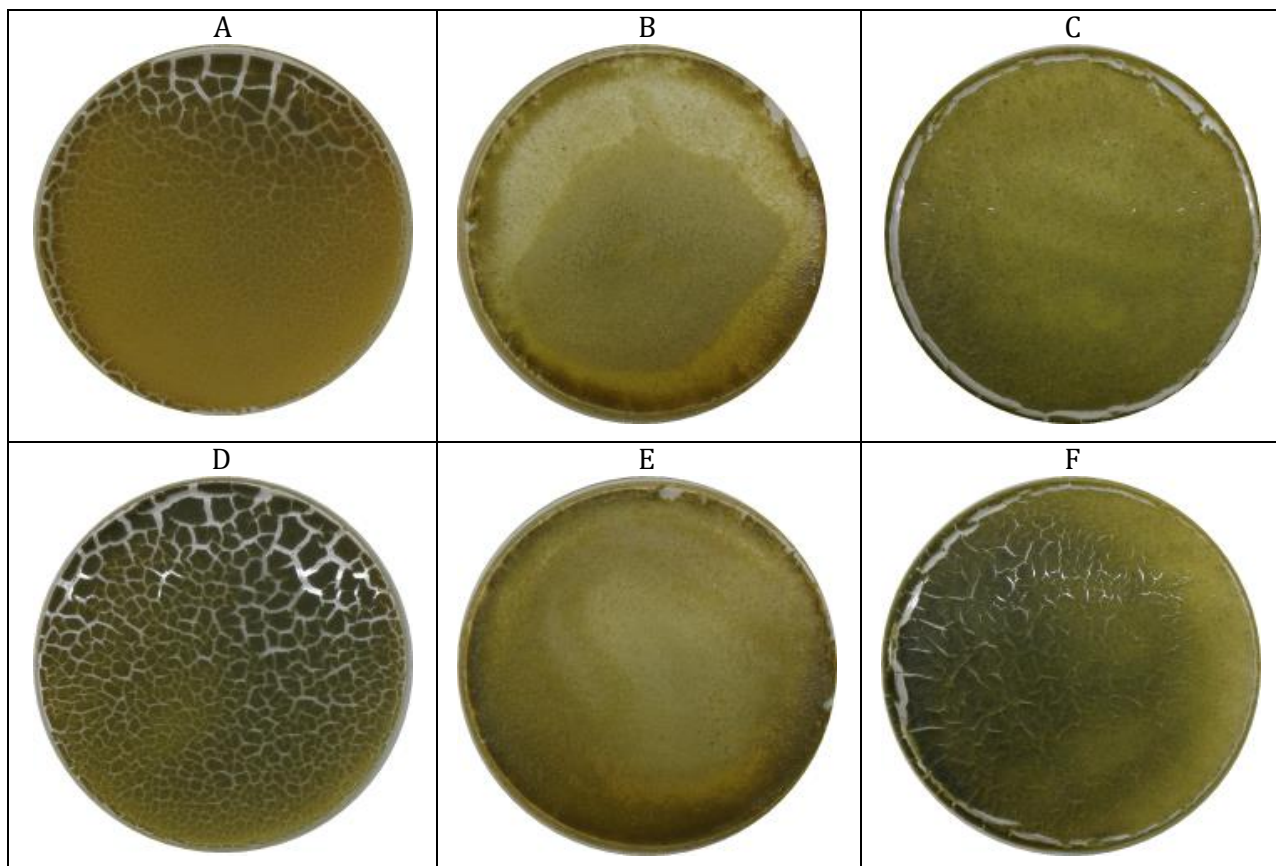
(p/p) e todos os filmes foram homogeneizados com WPC, água e 5 % de glicerol (p/p) (procedimento descrito no ponto 3.6). O ensaio com 3 % (p/p) de extrato não diluído, não permitiu obter um filme, já que a solução não conseguia secar totalmente, apresentando uma textura pastosa que a impedia de se separar da superfície de Teflon® (Fig. 4.7. B). Por sua vez, o filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído (Fig. 4.7. D), mostrou-se quebradiço, não sendo possível separá-lo da superfície de contacto. Os filmes em que o extrato de alecrim foi diluído em etanol e depois homogeneizado com WPC, água e 5 % de glicerol (p/p) (Fig. 4.7. A e C), apresentaram-se quebradiços.



**Fig. 4.7.** Otimização da incorporação do extrato no filme à base de proteína de soro de leite com 5% de glicerol (p/p). A – Filme com 3 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em etanol; B – Filme com 3 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído; C – Filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em etanol; D – Filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído.

Tendo em conta os resultados dos filmes com 5 % de glicerol (p/p) (Fig. 4.7), incorporaram-se as mesmas percentagens de extrato de alecrim num filme com 10 % de glicerol (p/p) (Fig. 4.7). Os filmes com 3 e 5 % (p/p) de extrato de alecrim diluídos em etanol

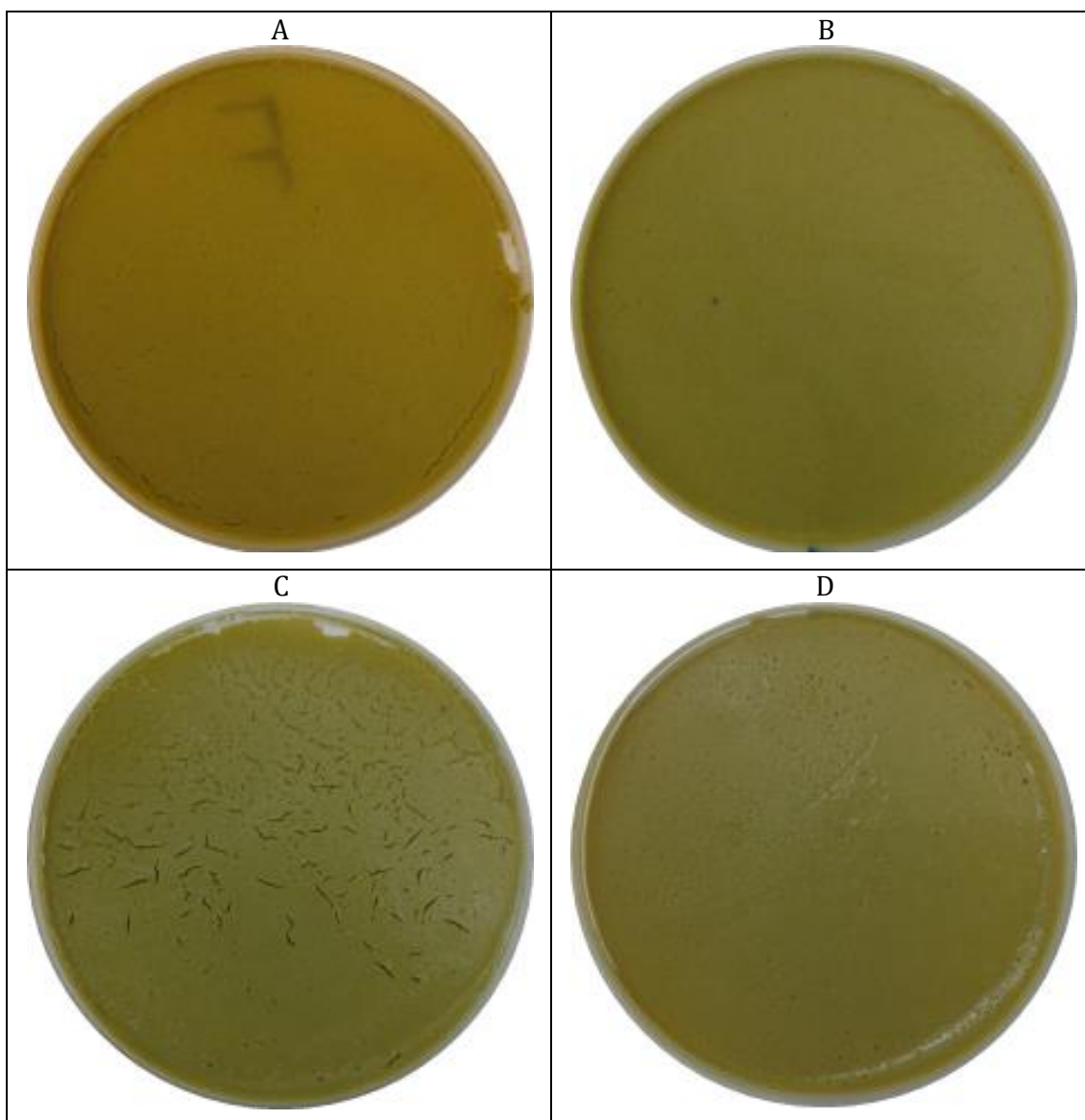
(Fig. 4.8. A e D) ficaram quebradiços e não se conseguiram separar das superfícies testadas. Os filmes com 3 e 5 % (p/p) de extrato de alecrim não diluídos incorporados com WPC, água e 10 % glicerol (Fig. 4.8. B e E) apresentaram uma textura pastosa e também não se conseguiram separar das superfícies testadas. Os filmes em que a percentagem de água:etanol foi de 80:20 (Fig. 4.8. C e F), não se conseguiram separar das superfícies testadas, ficando com uma textura pastosa e o filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim ficou quebradiço (Fig. 4.8. F).



**Fig. 4.8.** Otimização da incorporação do extrato no filme à base de proteína de soro de leite com 10% de glicerol (p/p). A- Filme com 3 % de extrato de alecrim diluído em etanol, homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p); B - Filme 3 % de alecrim não diluído homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p); C - Filme 3 % de alecrim não diluído, homogeneizado com WPC, 10 % de glicerol (p/p) e água:etanol (80:20 %) (p/p); D - Filme com 5 % de extrato de alecrim diluído em etanol, homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p); E - Filme com 5 % de extrato de alecrim não diluído homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p); F - Filme 5 % de alecrim não diluído, homogeneizado com WPC, 10 % de glicerol (w/w) e água:etanol (80:20 %) (p/p).

Numa nova abordagem, tentou-se diluir o extrato em 25 ml etanol. Depois do filme homogeneizado, secou-se a 30 °C e à temperatura ambiente. Os filmes secos a 30 °C ficaram com uma textura pastosa e quebradiços e não se conseguiram separar da superfície de

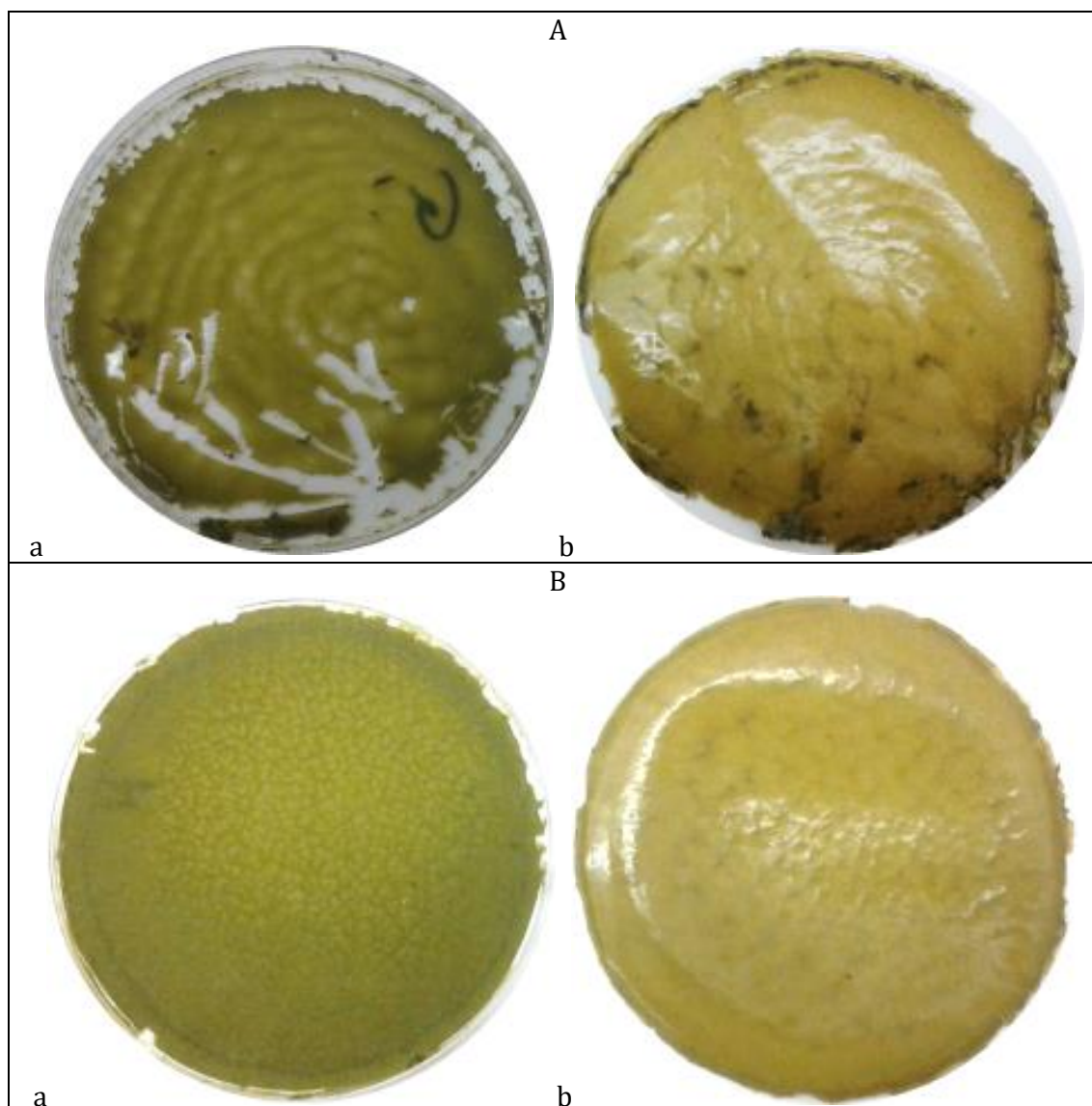
evaporação (Fig. 4.9. A e C). Os filmes secos à temperatura ambiente ficaram com uma textura pastosa e não secaram totalmente (Fig. 4.9. B e D).



**Fig. 4.9.** Otimização da incorporação do extrato de alecrim diluído em etanol no filme à base de proteína de soro de leite com 10% de glicerol (p/p). Evaporação do solvente em estufa e à temperatura ambiente. A - Filme com 3 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em 25 ml de etanol homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p), seco em estufa (30 °C); B - Filme com 3 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em 25 ml de etanol homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p), seco à temperatura ambiente; C - Filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em 25 ml de etanol homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p), seco em estufa (30 °C); D - Filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim diluído em 25 ml de etanol homogeneizado com WPC, água e 10 % de glicerol (p/p), seco à temperatura ambiente.

Dados os resultados insatisfatórios, tentou-se homogeneizar o extrato, não diluído, em 8 % de glicerol. A secagem foi feita à temperatura ambiente. Nos dois casos (3 e 5% de

extrato), apesar de se conseguir retirar o filme da superfície de contacto, uma grande percentagem de extrato ficou agarrada à superfície de secagem (Fig. 4.10).

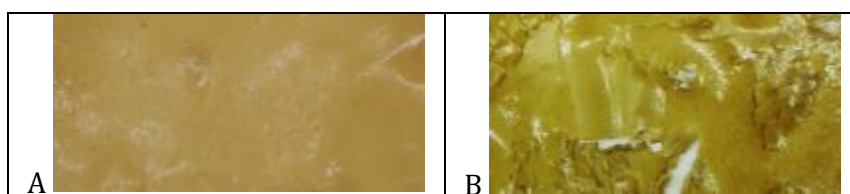


**Fig. 4.10.** Otimização da incorporação do extrato de alecrim não diluído (3 e 5%, p/p) no filme à base de proteína de soro de leite com 8% de glicerol (p/p). Evaporação do solvente à temperatura ambiente. A – Filme com 3 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído homogeneizado com WPC, água e 8 % de glicerol (p/p): a – parte colada à placa e b – parte descolada da placa; B - Filme com 5 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído homogeneizado com WPC, água e 8 % de glicerol (p/p): a – parte colada à placa e b – parte descolada da placa.

Não tendo sido satisfatórios os resultados anteriores, testaram-se menores % de extrato (1 e 2 %, p/p), mantendo-se os 8 % de glicerol. Neste caso, foi possível retirar ambos



os filmes (1 e 2%, p/p) das superfícies de evaporação, mas com uma certa dificuldade (Fig. 4.11). Por fim, testou-se revestir os tabuleiros de Teflon® com papel de alumínio. Os filmes cujo processo de secagem foi realizado em contacto direto com papel de alumínio, conseguiram-se separar mais facilmente. No entanto, o filme com 2 % (p/p) de extrato ainda deixou uma pequena quantidade de extrato aderida ao papel de alumínio pelo que, só se considerou o filme com 1 % (p/p) de extrato.



**Fig. 4.11.** Otimização da incorporação do extrato de alecrim (1 e 2%, p/p) no filme à base de proteína de soro de leite com 8% de glicerol (p/p). A – Filme com 1 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído, homogeneizado com WPC, água e 8 % de glicerol (p/p); B - Filme com 2 % (p/p) de extrato de alecrim não diluído, homogeneizado com WPC, água e 8 % de glicerol (p/p).

## 4.5. Capacidade Antimicrobiana dos Filmes Ativos

Todos os testes para avaliar a capacidade antimicrobiana dos filmes ativos foram realizados em triplicado. Como se pode observar pela Tabela 4.1 o filme ativo possui uma capacidade de inibição contra a *Listeria monocytogenes* quando comparado com o filme controlo.

**Tabela 4.1.** Contagens das placas de Petri inoculadas com *Listeria monocytogenes*.

Filme	Diluições	Teste A	Teste B	Teste C	Média	Log Nº de bactérias viáveis por cm <sup>2</sup>
<b>Filme Controlo após inoculação (TO)</b>	<b>1 ml</b>	>300	>300	>300	>300	3,06
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	131	244	*	188	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	7	24	*	16	
<b>Filme Controlo após 24h (T24)</b>	<b>1 ml</b>	>300	>300	>300	>300	2,62
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	54	92	56	67	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	5	11	5	7	
<b>Filme Ativo após 24h (T24)</b>	<b>1 ml</b>	5	4	5	5	0
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	3	1	4	3	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	<1	<1	<1	<1	

\*A placa apresentou contaminação por outro microrganismo.

Relativamente à capacidade antimicrobiana do extrato de alecrim contra o *Staphylococcus aureus*, o procedimento foi igual ao utilizado para a *Listeria monocytogenes*.

Pela Tabela 4.2, pode-se concluir que o filme ativo tem uma grande capacidade de inibição contra *Staphylococcus aureus*. Comparativamente com as placas do filme controlo, as placas do filme ativo não apresentaram presença da bactéria, concluindo-se que, o extrato de alecrim inibe 100 % o *Staphylococcus aureus*.

**Tabela 4.2.** Contagens das placas de Petri inoculadas com *Staphylococcus aureus*.

Filme	Diluições	Teste A	Teste B	Teste C	Média	Log N° de bactérias viáveis por cm <sup>2</sup>
<b>Filme Controlo após inoculação (T0)</b>	<b>1 ml</b>	>300	>300	>300	>300	2,73
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	126	67	71	88	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	6	3	7	5	
<b>Filme Controlo após 24h (T24)</b>	<b>1 ml</b>	>300	>300	>300	>300	2,50
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	60	45	45	50	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	5	2	5	4	
<b>Filme Ativo após 24h (T24)</b>	<b>1 ml</b>	0	0	0	0	0
	<b>10<sup>-1</sup> ml</b>	0	0	0	0	
	<b>10<sup>-2</sup> ml</b>	0	0	0	0	

A capacidade antimicrobiana do filme ativo contra *Staphylococcus aureus* descrita neste trabalho está em concordância com os resultados obtidos no trabalho desenvolvido por Bonilla e Sobral (2016). Os autores concluíram que filmes feitos a partir de partes iguais de gelatina e quitosano incorporados com 1 % de um extrato etanólico comercial de alecrim têm uma ação inibidora contra *Staphylococcus aureus* (Bonilla e Sobral 2016).

## 4.6. Estado de oxidação lipídica do alimento modelo embalado com filmes ativos

### 4.6.1. Determinação do índice de peróxidos

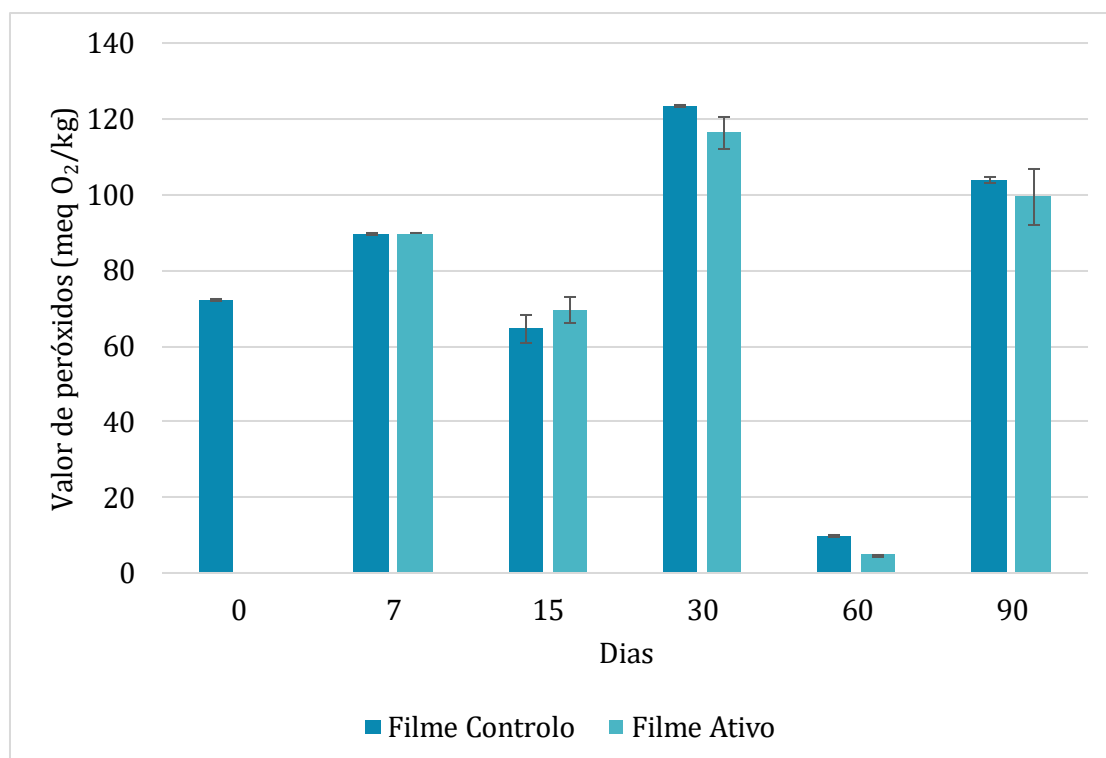
Relativamente ao ensaio dos peróxidos, o valor dos peróxidos do salame após 7 dias de armazenamento a 5 °C, quer do filme controlo quer do filme ativo, subiu em relação ao valor do tempo inicial (t=0 dias). No salame em contacto com o filme, após 15 dias, o valor dos peróxidos no caso do filme ativo foi ligeiramente superior (69,75 meq/kg) ao valor dos peróxidos do salame em contato com o filme controlo (64,72 meq/kg). Esta situação inverteu-se nas fatias analisadas ao fim de 30 dias de armazenamento tendo o valor dos peróxidos do filme controlo sido ligeiramente superior (123,64 meq/kg) ao valor dos

peróxidos do salame em contacto o filme ativo (116,35 meq/kg). Após 60 dias de armazenamento, ocorreu uma descida abrupta nos valores dos peróxidos, tal como ocorreu no ensaio do hexanal, o que pode significar que a oxidação lipídica chegou a um máximo e novos produtos de deterioração se começaram a formar (Erdmann *et al.* 2016). Nas fatias armazenadas durante 90 dias, novamente o salame embalado com o filme ativo apresentar um valor de peróxidos (99,47 meq/kg) inferior ao das fatias embaladas com o filme controlo (103,96 meq/kg).

Os resultados obtidos neste ensaio, apesar de não apresentarem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), apontam para uma possível inibição da oxidação lipídica por parte do extrato de alecrim às fatias de salame armazenadas por um período de 30 dias.

No estudo realizado por Waszkowiak e Dolata (2007), salsichas de carne de porco tipo Wiener e salsichas de fígado de porco foram homogeneizadas com um extrato etanólico de alecrim. O extrato de alecrim foi incorporado nas salsichas de três maneiras diferentes: diretamente em pó (0,02 g de extrato), impregnadas em fibras de colagénio (2 g de extrato) e impregnadas em colagénio hidrolisado (2 g de extrato). Foram armazenadas por diferentes períodos de tempo, a vácuo e ao ar. As salsichas com o extrato apresentaram um menor índice de peróxidos que as salsichas controlo (sem o extrato de alecrim), o que comprova que o extrato de alecrim tem uma ação protetora contra a oxidação lipídica (Waszkowiak e Dolata 2007).

Goméz-Estaca *et al.* (2007) também utilizaram este ensaio para medir o estado de oxidação da gordura de filetes de sardinha embalados com um filme edível de gelatina incorporado com um extrato de alecrim aquoso. De acordo com o que aconteceu no teste de TBARS, o valor de peróxidos dos filetes embalados com a embalagem ativa esteve sempre abaixo do valor de peróxidos dos filetes embalados com o filme controlo. Entre o 2º e o 8º dia de armazenamento, o valor de peróxidos manteve-se relativamente estável, tendo subido aos 14 dias, em ambos os casos e, no caso dos filetes embalados com a embalagem ativa, desceu aos 21 dias de armazenamento. A eficácia do extrato de alecrim na inibição da oxidação lipídica é mais uma vez comprovada no período de 30 dias (aproximadamente) de armazenamento (Goméz-Estaca *et al.* 2007).



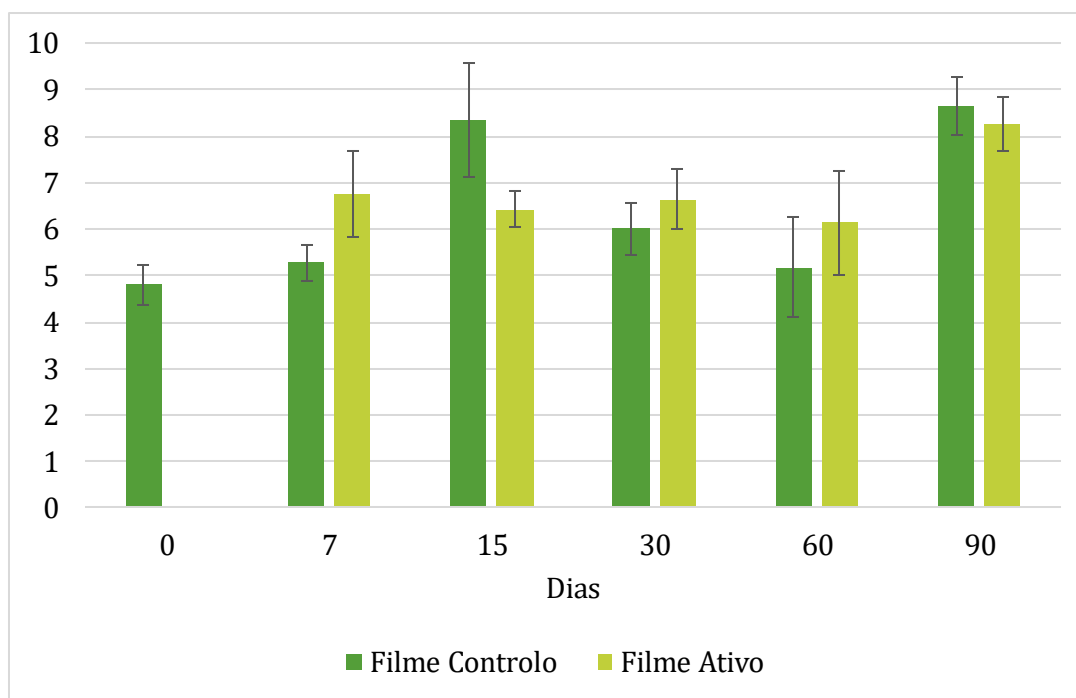
**Fig. 4.12.** Resultados do índice de peróxidos.

#### 4.6.2. Determinação do valor de *p*-anisidina

A *p*-anisidina reage por condensação com os compostos carbonílicos, preferencialmente com os dienais conjugados ou 2-alquenais, originando uma solução de cor amarela. Quanto menor o valor de *p*-anisidina encontrado, menor o índice de oxidação de uma determinada amostra (Guo *et al.* 2016).

Os resultados deste ensaio (Fig. 4.13) indicam que o valor de *p*-anisidina das fatias de salame embaladas com o filme controlo e o filme ativo não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ). Isto indica que este ensaio não permite concluir sobre a atividade protetora dos filmes ativos com extrato de alecrim em relação aos filmes controlo.





**Fig. 4.13.** Resultados do ensaio da *p*-anisidina.

No estudo realizado por Guo *et al.* (2016), um extrato etanólico de alecrim foi analisado e comparado com antioxidantes sintéticos (BHA e TBHQ – do inglês, *Tertiarybutyl hydroxyquinone*), com o objetivo de oferecerem proteção contra a oxidação lipídica de um óleo de palma comercial. Os autores adicionaram diretamente os antioxidantes ao óleo, em diferentes concentrações. Para testar os óleos, estes foram aquecidos a uma temperatura de 180 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, batatas (1 g por 10 g de óleo) foram adicionadas por 5 minutos. O óleo voltou a ser reaquecido por 15 minutos a 180 °C e o processo de fritura foi repetido 15 vezes durante 5 dias. O valor de *p*-anisidina do óleo controle no dia 0 foi de 1,7 tendo sempre aumentado e chegando aos 93,4 no 5º dia. O óleo com o extrato de alecrim no dia 0 foi de 1,7, tendo aumentado atingindo o valor de 87,5 no 5º dia. Relativamente aos óleos com os antioxidantes sintéticos, estes apresentaram sempre valores mais altos do que o óleo com o extrato de alecrim, embora inferiores ao do óleo controle, tendo atingido valores de 93,0 (BHA) e 89,8 (TBHQ) no 5º dia (Guo *et al.* 2016).

### 4.6.3. Teste de TBARS

Este método avalia o estado de oxidação da gordura através da medição do conteúdo de MDA presente na mesma.

Por análise dos resultados apresentados na Fig. 4.14, verifica-se que todas as amostras embaladas com o filme ativo apresentaram um conteúdo de MDA inferior ao conteúdo das amostras embaladas com o filme controlo, com a exceção da fatia de salame embalada com o filme ativo durante 30 dias no qual não há diferenças significativas entre as amostras ( $p > 0.05$ ). Estes resultados sugerem que o filme ativo com extrato de alecrim e à base de proteína de soro de leite inibe a oxidação lipídica do salame. Naveena *et al.* (2013) aplicaram diretamente, a rissóis de carne de frango e búfalo, diferentes concentrações de ácido carnósico extraído de folhas secas de alecrim. Os autores, ao avaliarem a carne pelo teste de TBARS, concluíram que as duas carnes com menor concentração de ácido carnósico mostraram uma redução de 39-49 % (búfalo) e 37-40 % (frango) de MDA, comparativamente com as carnes sem tratamento. Estes valores foram semelhantes aos obtidos nas carnes com a adição de BHT. Nas carnes com maior concentração de ácido carnósico, a redução de MDA foi de maior (86-96 % no caso da carne de búfalo e 78-87 % no caso da carne de frango), quando comparada com as carnes controlo (sem tratamento)(Naveena *et al.* 2013).

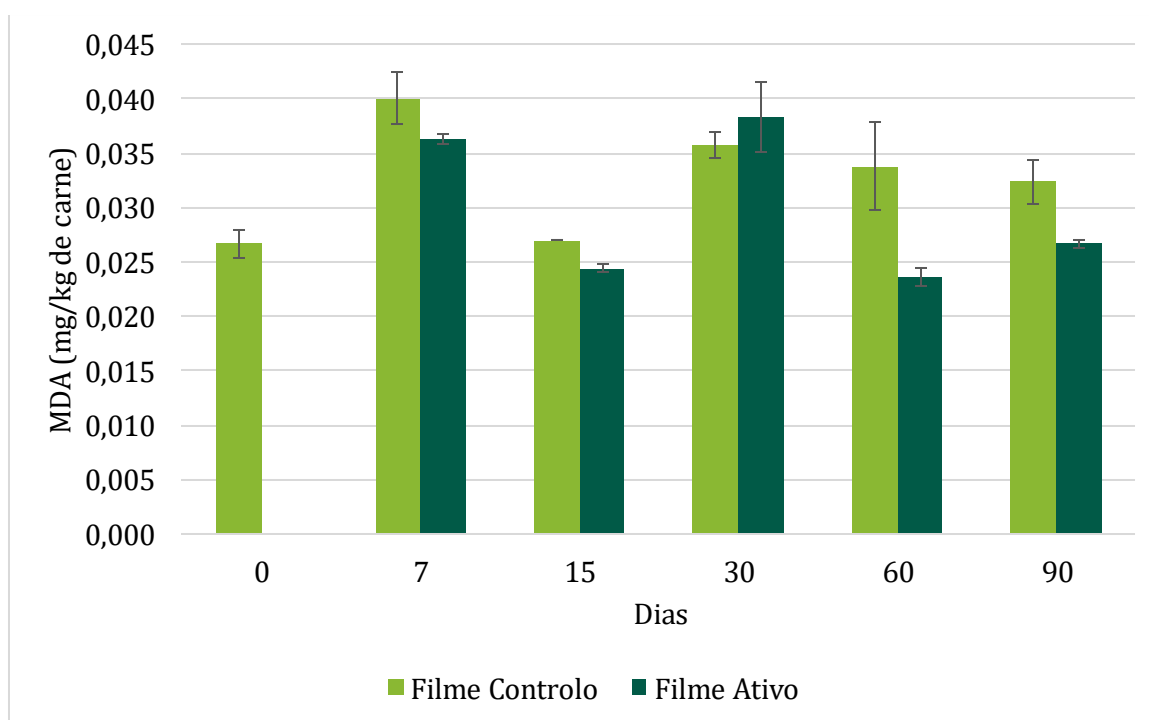


Fig. 4.14. Resultados do ensaio de TBARS.

Noutro estudo desenvolvido por Erdmann *et al* (2016), um extrato comercial de alecrim emulsionado com  $\omega$ -3 proveniente de peixe (emulsão óleo/água) foi adicionado a salsichas de porco. Estas foram cozinhadas (a 72 °C durante 1 hora), fatiadas e armazenadas em embalagens com atmosfera modificada, de forma a acelerar os processos de oxidação, durante 35 dias a 7 °C, protegidas da luz. Os valores de MDA nas salsichas controlo (sem o extrato de alecrim) começaram a aumentar durante os primeiros 21 dias de armazenamento. Em oposição, as salsichas homogeneizadas com o extrato de alecrim apresentaram valores 90 % mais baixos, comparativamente com as amostras controlo. Os autores observaram também um aumento significativo dos valores de MDA das amostras tratadas com o extrato de alecrim entre os dias 21 e 35. O contrário foi observado nas amostras controlo, sugerindo que o processo de oxidação da gordura das salsichas atingiu o seu auge, tendo os indicadores da oxidação sido transformados noutros produtos de decomposição (Erdmann *et al.* 2016).

Os autores Hernández-Hernández *et al.* (2009) também comprovaram a eficácia do extrato de alecrim contra a oxidação lipídica. Estes autores testaram três extratos de alecrim, extraídos com dois solventes diferentes (clorofórmio e etanol) e uma mistura dos dois extratos. Aplicaram os extratos diretamente a costeletas de porco, armazenando as amostras a 4 °C durante 72 horas, protegidas da luz. As concentrações de MDA mais baixas foram obtidas pelo extrato etanólico (0,566 mg/kg) e as amostras com extrato de clorofórmio apresentaram 0,722 mg MDA/kg, enquanto as amostras controlo apresentaram uma concentração de MDA superior (1,086 mg/kg) (Hernández-Hernández *et al.* 2009).

Relativamente ao filme analisado neste trabalho, conclui-se que este teve uma ação protetora da gordura do salame contra a oxidação lipídica. O aumento do valor de MDA nas fatias embaladas durante 30 dias pode ser comparado com o trabalho de Naveena *et al* (2013) que obteve os mesmos resultados, sendo o aumento explicado pelo auge do ciclo oxidativo.

Bolumar *et al.* (2011) analisaram rissóis de frango embalados com um polietileno de baixa densidade incorporado com um extrato etanólico de alecrim armazenados durante 25 dias. O conteúdo de MDA dos rissóis embalados com o filme ativo apresentou-se sempre inferior ao dos rissóis embalados com o filme controlo (sem o extrato de alecrim), com a exceção dos rissóis embalados durante 3 dias. Neste caso, o conteúdo de MDA dos rissóis embalados com o filme ativo esteve ligeiramente acima do conteúdo de MDA dos rissóis embalados com o filme controlo (Bolumar *et al.* 2011). No trabalho desenvolvido por Camo *et al.* (2008) a eficácia da aplicação direta do extrato de alecrim bem como a da utilização

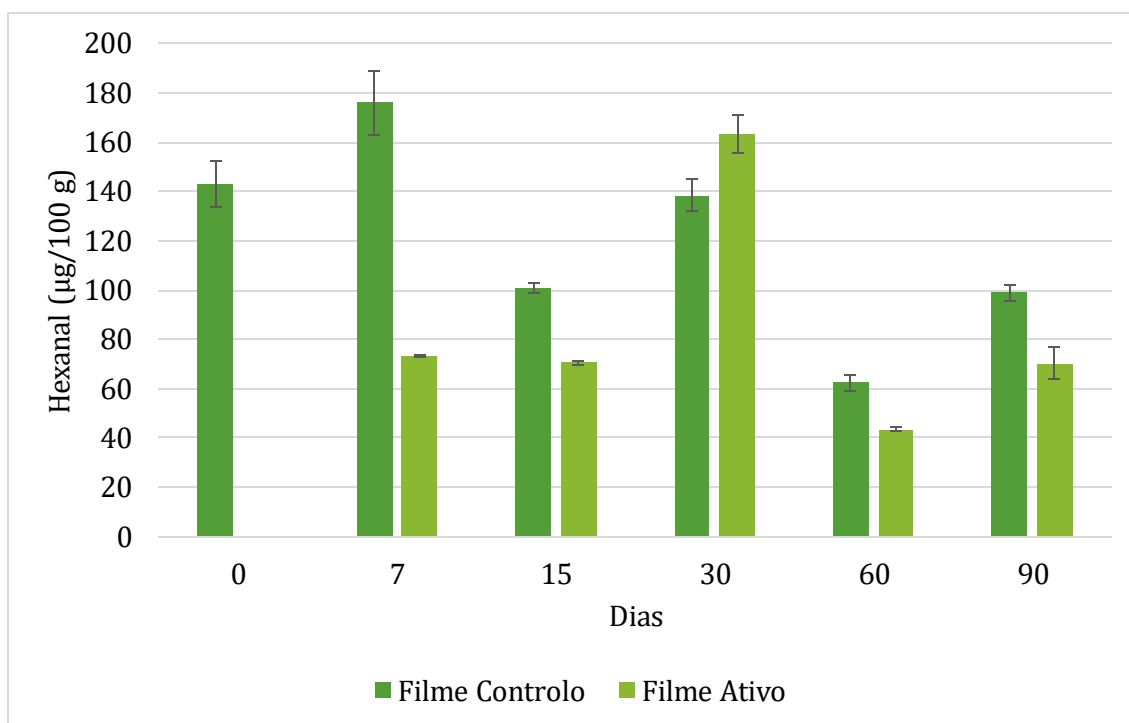
de um filme ativo com o mesmo extrato foi comprovada. Foram analisados bifes de cordeiro com extrato de alecrim e bifes de cordeiro revestidos com filmes ativos (incorporados com o mesmo extrato). A aplicação direta do extrato nos bifes foi feita através de *spray*. Ambos as amostras foram embaladas em atmosferas modificadas com 70 % de oxigénio, 20 % de dióxido de carbono e 10 % de azoto. Quer os bifes revestidos com o filme ativo, quer os bifes pulverizados com o extrato de alecrim, apresentaram um teor de MDA inferior às amostras controlo (sem adição de extrato de alecrim). Entre os dois, a amostra pulverizada com o extrato obteve um menor conteúdo de MDA do que a amostra revestida com o filme ativo (Camo *et al.* 2008).

A eficácia do extrato de alecrim na inibição ou redução da oxidação lipídica também pode ser observada noutras matrizes alimentares que não a carne ou derivados. No trabalho desenvolvido por Gómez-Estaca *et al.* (2007), um extrato aquoso de alecrim foi incorporado num filme edível à base de gelatina. O filme foi aplicado a filetes de sardinha e, relativamente à amostra controlo (embalada com o filme sem extrato), apresentou ao longo de 21 dias de armazenamento, um conteúdo de MDA inferior, atingindo o valor máximo aos 14 dias de armazenamento e voltando a descer aos 20 dias de armazenamento. Por sua vez, as amostras controlo apresentaram valores muito superiores às amostras com o filme ativo. Assim o extrato de alecrim demonstrou a sua capacidade de inibir a oxidação lipídica da gordura de peixe (Gómez-Estaca *et al.* 2007).

#### **4.6.4. Determinação do hexanal**

O hexanal é uma substância formada no processo de oxidação lipídica dos ácidos gordos. Como tal, serve como indicador do estado de oxidação lipídica de um determinado alimento com elevado conteúdo em gordura.

Os resultados obtidos neste ensaio (Fig. 4.15) estão de acordo com os resultados obtidos no teste de TBARS. Pode observar-se, com exceção das fatias de salame expostas aos filmes por 30 dias, que as fatias embaladas com o filme ativo mostraram um valor de hexanal inferior às fatias embaladas com o filme controlo. As fatias de salame embaladas por 60 dias apresentaram o menor valor de hexanal, quer nas fatias embaladas com o filme controlo, quer nas fatias embaladas com o filme ativo. Por sua vez, as fatias embaladas durante 7 dias com o filme controlo apresentaram a concentração mais elevada de hexanal.



**Fig. 4.15.** Resultados do ensaio do hexanal.

Madsen *et al.* (1998) avaliou emulsões óleo em água, homogeneizadas com alecrim e com extrato metanólico de alecrim. As emulsões foram armazenadas durante 24 semanas a 19 °C e expostas à luz. Segundo os resultados do ensaio do hexanal realizado pelos autores, o conteúdo de hexanal na emulsão incorporada com o extrato de alecrim só começou a aumentar a partir da 6ª semana, apresentando valores mais baixos do que a amostra controlo até à 8ª semana. Relativamente à emulsão incorporada com folhas secas de alecrim, esta apresentou na 14ª semana valores inferiores a 150 mg/kg, contrastando com os 600 mg/kg da amostra controlo e com os 750 mg/kg da amostra com o extrato de alecrim. Estes autores chegaram à conclusão que, embora o metanol seja um solvente de extração eficiente, é um antioxidante menos poderoso do que a planta em si, o que pode significar que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do alecrim não foram extraídos pelo solvente selecionado (Madsen *et al.* 1998). Os resultados deste estudo indicam que o alecrim possui na sua constituição compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação lipídica de alimentos com alto teor de gordura, mas que o solvente utilizado não é o mais indicado para obter os mesmos compostos. No presente estudo foi selecionado o etanol como solvente de extração, uma vez que este está autorizado para a extração do alecrim segundo a Diretiva 2010/67/UE e apresenta uma menor toxicidade que o metanol.

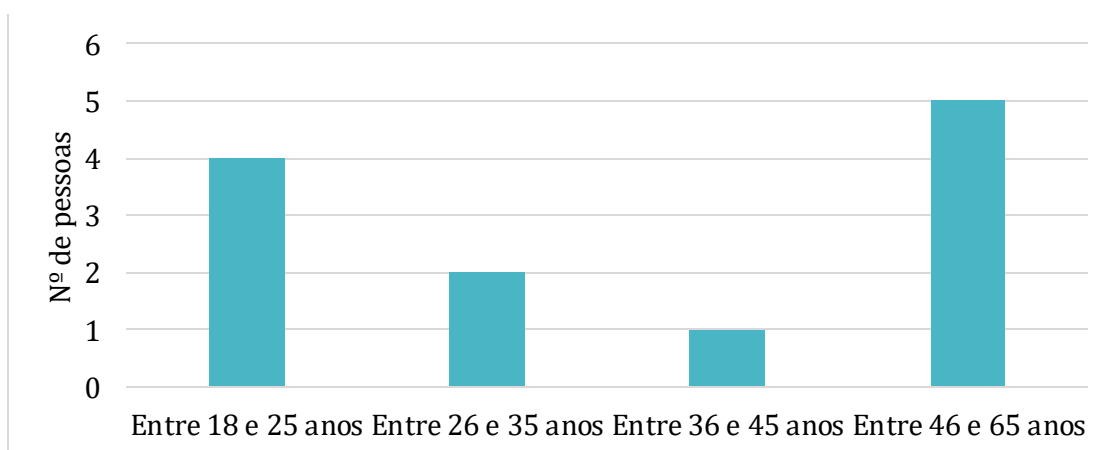
O estudo realizado por Erdmann *et al.* (2016), referido anteriormente para o teste de TBARS, também analisou a formação de hexanal nas salsichas incorporadas com emulsões

óleo em água. Os resultados do ensaio do hexanal foram semelhantes aos resultados obtidos pelo teste de TBARS, indicados no ponto anterior, mostrando que, a adição de extrato de alecrim a um alimento processado pode inibir a oxidação lipídica durante, pelo menos, 21 dias de armazenamento (Erdmann *et al.* 2016). Estes resultados vão de encontro aos resultados encontrados neste trabalho, uma vez que, como se pode observar na Fig. 4.15, o conteúdo de hexanal nas amostras embaladas foi aumentando em comparação com as amostras controlo, até aos trinta dias, começando depois a diminuir.

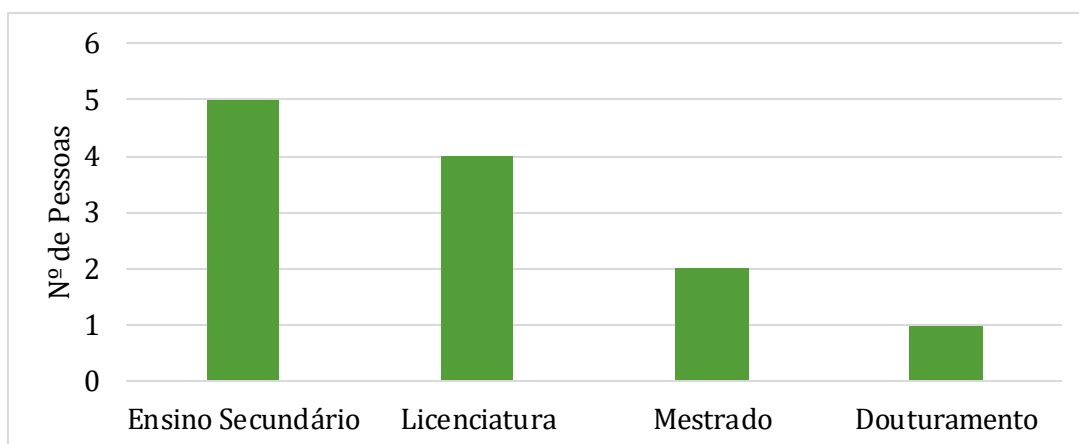
No estudo desenvolvido por Samotyja e Małecka (2007), foi estudado o efeito da adição de extrato de semente de groselha e de extrato de alecrim comercial a óleo de colza. A capacidade antioxidante de extratos de plantas foi investigada, tanto nas matérias-primas como nos substratos lipídicos emulsionados e foi comparada com a do  $\alpha$ -tocoferol e a do BHT. Os resultados comprovam mais uma vez a inibição do extrato de alecrim contra a oxidação lipídica em alimentos e produtos com alto teor lipídico e alertam para o facto que a polaridade dos antioxidantes e substratos lipídicos deve ser tida em conta na aplicação dos extratos naturais, já que os compostos naturais podem apresentar diferente atividade de acordo com o conteúdo de água do alimento (Samotyja e Małecka 2007).

## 4.7. Análise Sensorial

No questionário disponibilizado online obtiveram-se 18 respostas, mas apenas 12 indivíduos foram selecionados para o painel. As 4 pessoas restantes não apresentaram disponibilidade nas datas em que a análise sensorial foi realizada. Nas Fig. 4.16 e 4.17, estão representados as faixas etárias e o nível de escolaridade do painel sensorial.



**Fig. 4.16.** Gráfico com as idades do painel sensorial.



**Fig. 4.17.** Gráfico do nível de escolaridade (à direita) do painel.

Para facilitar a leitura dos resultados, foi criada uma chave para cada amostra que se encontra descodificada na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Código utilizado para melhor apresentação dos resultados.

Letra	Descrição
<b>A</b>	Fatia de salame embalada com o filme controlo durante 90 dias avaliada sem embalagem.
<b>B</b>	Fatia de salame embalada com o filme controlo durante 90 dias avaliada com embalagem
<b>C</b>	Fatia de salame embalada com o filme ativo durante 90 dias avaliada sem embalagem
<b>D</b>	Fatia de salame embalada com o filme ativo durante 90 dias avaliada com embalagem
<b>E</b>	Fatia de salame embalada com o filme controlo durante 30 dias avaliada sem embalagem
<b>F</b>	Fatia de salame embalada com o filme controlo durante 30 dias avaliada com embalagem
<b>G</b>	Fatia de salame embalada com o filme ativo durante 30 dias avaliada sem embalagem
<b>H</b>	Fatia de salame embalada com o filme ativo durante 30 dias avaliada com embalagem

Na Tabela 4.4 observa-se o valor  $p$  de cada descritor analisado nas duas provas, assim como o valor  $p$  entre as duas provas. Relativamente à primeira prova, verifica-se que existem diferenças significativas apenas no descritor do sabor amargo, enquanto na segunda prova, as diferenças significativas estendem-se aos sabores a alecrim e doce, aos aromas típico e a alecrim, aos cheiros típicos e a alecrim, à cor vermelha e ao aspeto apelativo. Entre as provas, foram apenas encontradas diferenças significativas no descritor de sabor acidez, o que quer dizer que os resultados de ambas as provas foram coerentes e coesos.

**Tabela 4.4.** Valor *p* das provas de análise sensorial de cada descritor e valor *p* entra as provas.

Descritores		Valor <i>p</i>		Valor <i>p</i> entre as Provas
		Prova 1	Prova 2	
Sabor	Acidez	0,93	0,73	$9,80 \times 10^{-4}$
	Alecrim	*	$3,62 \times 10^{-11}$	*
	Amargo	$3,54 \times 10^{-4}$	$8,08 \times 10^{-3}$	0,64
	Colorau	0,98	0,98	0,78
	Doce	*	0,03	*
	Estranho	0,06	0,10	0,29
	Fumo	0,80	0,99	0,41
	Picante	0,52	0,99	0,34
	Salgado	0,51	0,48	0,76
Textura	Fibrosa	0,93	0,74	0,89
	Gordurosa	0,96	0,69	0,34
	Maciez	0,51	0,99	0,07
	Suculência	0,65	0,19	0,15
Outras Caraterísticas	Aroma a Alecrim	*	$1,51 \times 10^{-8}$	*
	Aroma Típico	0,11	$1,15 \times 10^{-4}$	0,76
	Aspeto Apelativo	0,40	0,01	0,33
	Cheiro a Alecrim	*	$6,19 \times 10^{-8}$	*
	Cheiro Típico	0,30	$4,04 \times 10^{-5}$	0,37
	Cor Vermelha	0,29	$1,91 \times 10^{-4}$	0,95
* não foi realizada prova				

As médias ajustadas para cada descritor podem ser observadas nas Tabelas 4.5 e 4.6. Na primeira prova, os resultados para cada descritor foram bastante semelhantes, sendo as amostras consideradas pouco salgadas, com pouco sabor a fumo e de aspeto apelativo. Pela leitura das Fig. 4.18 e 4.19 conclui-se que a amostra D foi considerada a amostra mais estranha e, juntamente com a H, a mais amarga. As amostras D e H também foram consideradas menos vermelhas e as amostras C e D as amostras com menos cheiro e aroma típico, comparativamente com as outras amostras.

Nesta primeira prova, o descritor do sabor amargo foi o único que apresentou diferenças significativas. As amostras consideradas menos amargas foram a B e a E. A amostra H, considerada a mais amarga, apresentou diferenças significativas quando comparada com as amostras A, B, E e F. Também foram verificadas diferenças significativas entre as amostras B e D, e entre as amostras D e E.

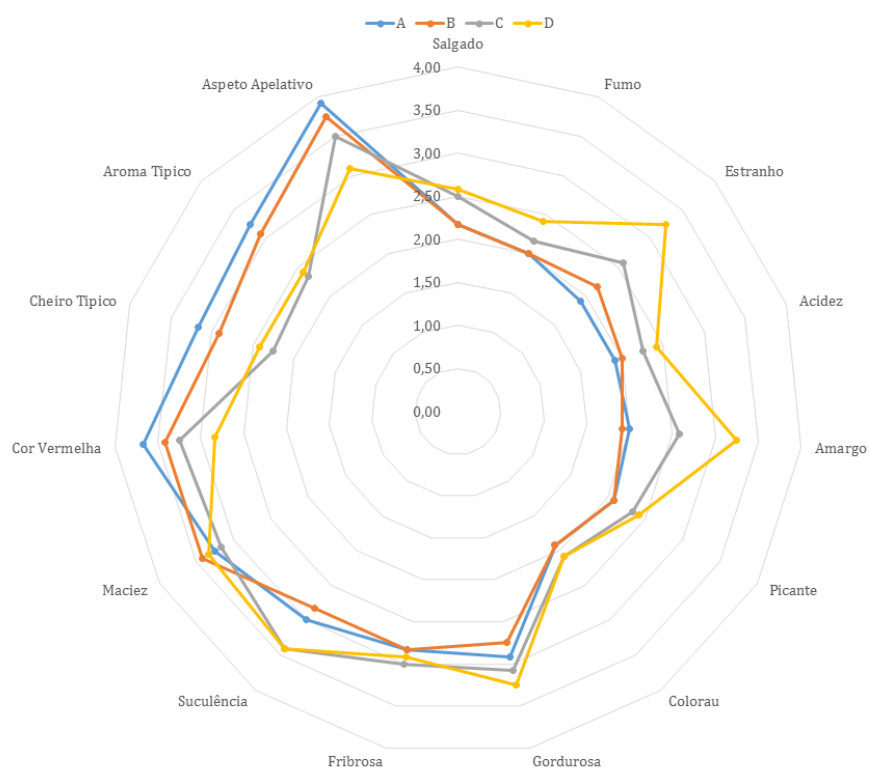
O aspeto de todas as amostras foi considerado apelativo. A amostra menos apelativa foi a amostra D, que corresponde à fatia de salame embalada por 90 dias com o filme ativo e provada com embalagem. A amostra mais apelativa foi a amostra E, que corresponde à fatia de salame embalada por 30 dias com o filme controlo provada sem embalagem.



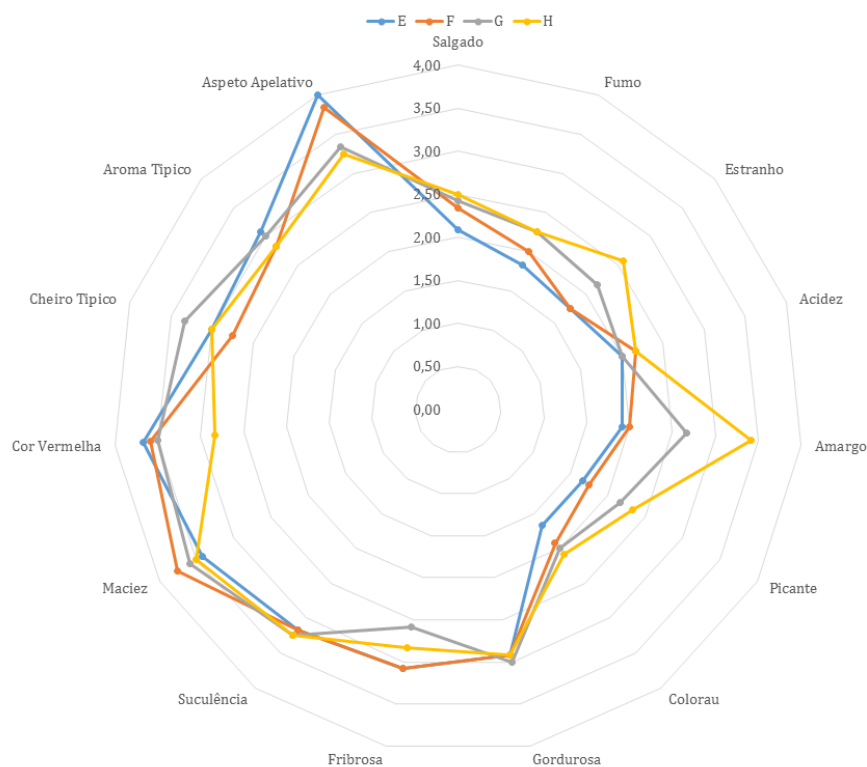
**Tabela 4.5.** Tabela com o valor médio de cada descritor da primeira prova.

Descritores	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Acidez</b>	1,92	2,00	2,25	2,42	2,00	2,17	2,00	2,17
<b>Amargo</b>	2,00	1,92	2,58	3,25	1,92	2,00	2,67	3,42
<b>Aroma Típico</b>	3,25	3,08	2,33	2,42	3,08	2,83	3,00	2,83
<b>Aspetto Apelativo</b>	3,92	3,75	3,50	3,08	4,00	3,83	3,33	3,25
<b>Cheiro Típico</b>	3,17	2,92	2,25	2,42	3,00	2,75	3,33	3,00
<b>Colorau</b>	1,92	1,92	2,08	2,08	1,67	1,92	2,00	2,08
<b>Cor Vermelha</b>	3,67	3,42	3,25	2,83	3,67	3,58	3,50	2,83
<b>Estranho</b>	1,92	2,17	2,58	3,25	1,75	1,75	2,17	2,58
<b>Fibrosa</b>	2,83	2,83	3,00	2,92	3,08	3,08	2,58	2,83
<b>Fumo</b>	2,00	2,00	2,17	2,42	1,83	2,00	2,25	2,25
<b>Gordurosa</b>	2,92	2,75	3,08	3,25	2,92	2,92	3,00	2,92
<b>Maciez</b>	3,25	3,42	3,17	3,33	3,42	3,75	3,58	3,50
<b>Picante</b>	2,08	2,08	2,33	2,42	1,67	1,75	2,17	2,33
<b>Salgado</b>	2,17	2,17	2,50	2,58	2,08	2,33	2,42	2,50
<b>Suculência</b>	3,00	2,83	3,42	3,42	3,17	3,17	3,25	3,25

Cor azul – os valores mínimos para cada descritor;  
Cor verde - os valores máximos para cada descritor.



**Fig. 4.18.** Gráfico em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras A, B, C e D (descodificação disponível na Tabela 4.3).



**Fig. 4.19.** Gráfico em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H (descodificação disponível na Tabela 4.3).

Na análise sensorial conduzida pelos autores Frutos e Hernández-Herrero (2005) avaliou-se um molho com um extrato comercial de alecrim. A presença do extrato de alecrim só foi detetada pelo painel sensorial na amostra com maior teor de extrato (6 g/l) (Frutos e Hernández-Herrero 2005). Por sua vez, noutro estudo conduzido por Chammem *et al.* (2015), a adição de um extrato de alecrim ao óleo de fritura, melhorou a crocância e o sabor de batatas fritas, após 15 utilização do óleo com o extrato de alecrim. Os autores também referem que foi notado um *flavour*<sup>8</sup> agradável durante as frituras das batatas no óleo com o extrato de alecrim.

<sup>8</sup> A expressão *flavour* diz respeito a uma mistura de sensações entre o cheiro e o sabor e não à sua tradução do inglês.

**Tabela 4.6.** Tabela com o valor médio de cada descritor da segunda prova.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
<b>Acidez</b>	2,27	2,09	2,82	2,82	2,64	2,55	2,64	2,73
<b>Amargo</b>	2,09	1,91	3,09	3,45	2,18	2,18	2,64	3,36
<b>Aroma a Alecrim</b>	1,36	1,82	2,91	2,82	1,18	1,64	3,00	3,64
<b>Aroma Típico</b>	3,45	3,00	2,18	2,55	3,82	3,55	2,64	2,27
<b>Aspetto Apelativo</b>	3,91	3,45	3,27	2,73	3,82	3,73	3,36	2,80
<b>Cheiro a Alecrim</b>	1,45	1,91	3,00	3,00	1,36	1,64	2,82	3,00
<b>Cheiro Típico</b>	3,82	3,09	2,45	2,64	3,82	3,55	2,82	2,45
<b>Colorau</b>	2,00	2,00	1,91	1,73	1,91	2,09	2,09	2,09
<b>Cor Vermelha</b>	3,91	3,18	3,36	2,82	3,91	3,73	3,36	2,36
<b>Doce</b>	2,45	2,64	2,00	1,55	1,91	2,64	2,00	1,82
<b>Estranho</b>	1,55	1,73	2,27	2,45	1,45	1,82	2,18	2,64
<b>Fibrosa</b>	2,73	2,64	3,18	3,00	3,00	2,73	3,09	2,91
<b>Fumo</b>	2,36	2,18	2,27	2,09	2,18	2,09	2,27	2,00
<b>Gordurosa</b>	3,00	3,00	3,45	3,00	3,27	2,73	3,27	2,82
<b>Maciez</b>	3,36	3,27	3,09	3,27	3,27	3,27	3,36	3,36
<b>Picante</b>	1,91	1,82	2,09	2,09	1,91	2,00	2,18	2,00
<b>Sabor a Alecrim</b>	1,36	1,73	3,09	2,91	1,27	1,45	3,09	3,64
<b>Salgado</b>	2,18	2,45	2,36	2,27	2,64	2,64	2,45	2,00
<b>Suculência</b>	3,09	3,09	3,27	2,91	3,18	2,73	3,27	2,55
Cor azul – os valores mínimos para cada descritor; Cor verde - os valores máximos para cada descritor.								

Relativamente à segunda prova, foram adicionados mais quatro descritores: o sabor a alecrim, o sabor doce, o cheiro a alecrim e o aroma a alecrim. Nesta prova, ao contrário do que sucedeu na primeira prova, foram 9 os descritores que apresentaram diferenças significativas. Na Tabela 4.7 estão dispostas a amarelo as diferenças significativas entre as várias amostras nos respetivos descritores.

**Tabela 4.7.** Diferenças significativas entre as amostras na segunda prova.

Amargo								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Alecrim								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Doce								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Cor Vermelha								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Cheiro Típico								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Aroma Típico								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

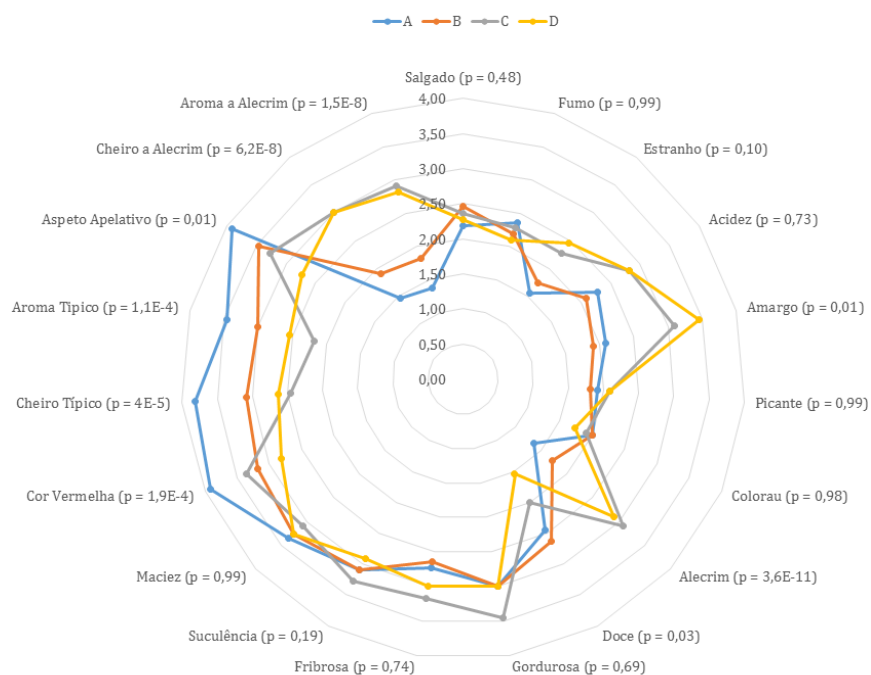
  

Aspetto Apelativo								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

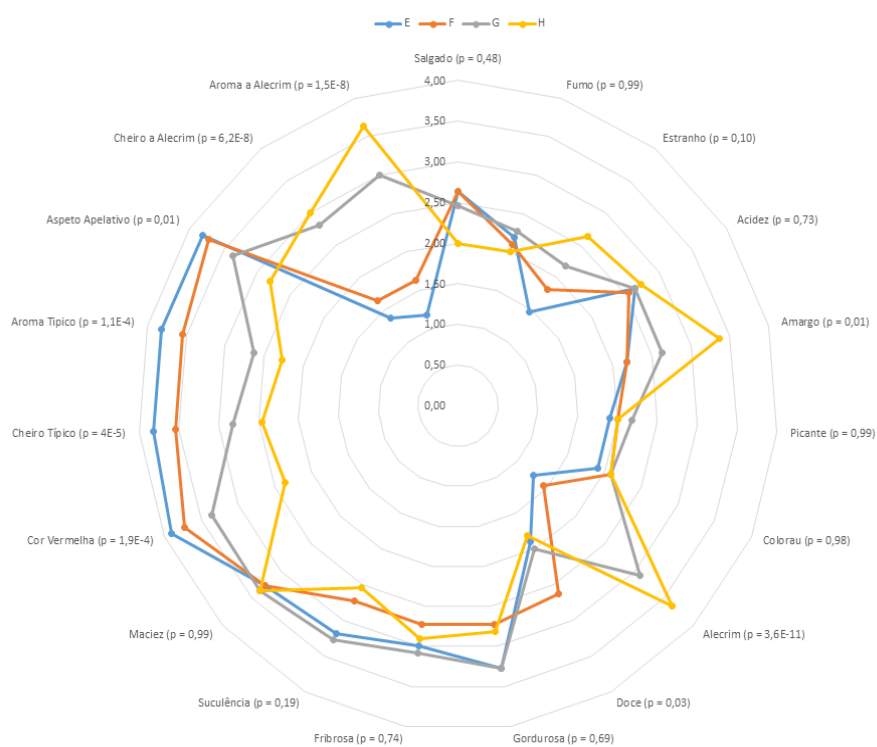
Cheiro Alecrim								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Aroma a Alecrim								
	A	B	C	D	E	F	G	H
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

As diferenças significativas são maioritariamente entre as amostras embaladas com o filme controlo e com o filme ativo, logo são explicadas pela adição do extrato de alecrim. Tal como na primeira prova, o facto de as amostras terem sido provadas com e sem embalagem não parece exercer qualquer diferença significativa sobre o sabor, a textura e as outras características do alimento testado. Nas Fig. 4.20 e 4.21 podem-se observar as características das várias amostras numa representação em teia.



**Fig. 4.20.** Representação em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H (descodificação disponível na Tabela 4.3).



**Fig. 4.21.** Representação em teia com os resultados da segunda prova relativamente às amostras E, F, G e H (descodificação disponível na Tabela 4.3).

No que diz respeito aos descritores de sabor, com a exceção dos sabores doce, alecrim e amargo, as amostras são consideradas relativamente homogêneas. Nas amostras que têm sabores diferentes, essas diferenças são explicadas pela adição de extrato de alecrim à embalagem e com o período de tempo que estiveram em contato com o filme. O facto de serem ou não degustadas com o filme controlo ou ativo parece contribuir para diferenças no sabor das mesmas. A amostra considerada mais apelativa foi a amostra A, embalada durante 90 dias com o filme controlo e provada sem embalagem, em oposição à amostra D, embalada com o filme ativo provada com o filme pelo mesmo período de tempo. As amostras com menos aroma e sabor a alecrim são as amostras embaladas com o filme controlo. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados na primeira prova.

O painel de provadores selecionado para estas duas provas, considerou as fatias embaladas com o filme ativo apelativas, com um ligeiro sabor amargo, macias e suculentas. Considera-se que a apreciação global das fatias de salame embaladas com o filme ativo foi positiva e que a nova embalagem ativa poderia ser atrativa para o consumidor.



## Conclusão

Os objetivos propostos inicialmente foram atingidos com sucesso. Entre os extratos de plantas aromáticas estudados e as suas combinações, o que foi escolhido para ser incorporado no filme à base de proteína de soro de leite foi o extrato etanólico de alecrim da marca comercial C. Esta escolha foi baseada não só nos resultados obtidos pelos dois ensaios de capacidade antioxidante (Sistema de inibição do radical livre DPPH e Teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno) utilizados, mas também com base na menor toxicidade do solvente de extração.

O extrato selecionado foi posteriormente estudado quanto à sua composição em ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol e às suas propriedades antimicrobianas, tendo apresentado capacidade inibitória frente ao *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *C. perfringens*.

Posteriormente foi otimizado o processo de elaboração do filme ativo à base de proteína de soro de leite. Foram testadas diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e de extrato ativo. As percentagens que permitiram obter melhores resultados foram 8% (p/p) de glicerol e 1% (p/p) de extrato de alecrim.

O filme ativo à base de proteína de soro de leite foi posteriormente testado quanto à sua eficácia em retardar a oxidação lipídica de um alimento modelo com alto conteúdo em gordura (salame). Para tal foram realizados quatro ensaios (teste de TBARS, índice de Peróxidos, valor da *p*-anisidina e determinação do hexanal). Todos os ensaios, com exceção do valor de *p*-anisidina que se mostrou inconclusivo, permitiram concluir que o filme ativo tende a proteger o alimento do fenómeno de oxidação ao longo de 90 dias de armazenamento em relação a um filme controlo (sem extrato ativo).

O filme ativo com extrato de alecrim mostrou também uma grande capacidade antimicrobiana contra os microrganismos *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Por fim, foi



realizada a análise sensorial do novo filme ativo e edível, que permitiu concluir que as amostras embaladas com o mesmo apresentaram aspeto apelativo, e conservaram as características organoléticas das fatias de salame. Assim, no caso de ser futuramente comercializada, é expectável que esta nova embalagem alimentar tenha boa aceitação por parte dos consumidores.

## Perspetivas Futuras

Outros estudos são necessários para melhorar a incorporação do extrato de alecrim na embalagem à base de proteína de soro de leite e para testar a eficácia frente à oxidação lipídica durante períodos de armazenamento mais longos e em relação a outros alimentos com alto teor lipídico.

Tendo em conta as várias propriedades biológicas do extrato de alecrim desenvolvido neste trabalho, é de grande interesse a sua aplicação em matrizes alimentares e embalagens ativas como aditivo alimentar. Assim, atendendo às dificuldades encontradas no processo de otimização do filme ativo, para se conseguir incorporar uma maior percentagem de extrato no filme ativo ou melhorar a sua libertação controlada, seria interessante estudar o encapsulamento do extrato através de, por exemplo, ciclodextrinas. As ciclodextrinas são hidratos de carbono complexos compostos por unidades de glicose que podem interceder como veículos de solubilização em água e que já foram utilizadas para incorporar óleos essenciais (Hill *et al.* 2013). Uma outra alternativa é a incorporação do extrato de alecrim em filmes de quitosano em vez de filmes de proteína de soro de leite.

Outro estudo complementar que teria muito interesse seria o estudo das propriedades mecânicas, óticas, físicas e microestruturais do novo filme, de forma a melhorar as mesmas.

A incorporação do extrato ativo sob a forma de nanopartículas também poderia ser muito interessante, já que poderia incrementar a sua eficácia e permitir a utilização de menores quantidades de extrato.



## Referências

- Aburjai T, Natsheh FM (2003) Plants Used in Cosmetics. *Phyther Res* 17:987–1000. doi: 10.1002/ptr.1363
- Abu-shanab B, Adwan G (2004) Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish J Biol* 28:99–102.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria (2007) Base de Datos Española de Composición de Alimentos, BEDCA. [http://www.bedca.net/bdpub/index\\_en.php](http://www.bedca.net/bdpub/index_en.php). Acedido a 27 Sep 2016
- Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, et al (2006) Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr A* 1120:221–229. doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.056
- Amaral GP, de Carvalho NR, Barcelos RP, et al (2013) Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food Chem Toxicol* 55:48–55. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.038
- AOCS (1989) Official methods and recommended practices. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois
- Arvanitoyannis IS, Bosnea L (2004) Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:63–76. doi: 10.1080/10408690490424621
- Babovic N, Djilas S, Jadranin M, et al (2010) Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11:98–107. doi: 10.1016/j.ifset.2009.08.013
- Bahram S, Rezaei M, Soltani M, et al (2014) Whey Protein Concentrate Edible Film Activated with Cinnamon Essential Oil. *J Food Process Preserv* 38:1251–1258. doi:

10.1111/jfpp.12086

- Barata AM, Rocha F, Lopes V, Carvalho AM (2016) Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. *Ind Crops Prod* 88:8–11. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.02.035
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, et al (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem* 106:132–139. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.05.050
- Bolumar T, Andersen ML, Orlie V (2011) Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chem* 129:1406–1412. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.082
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Sci Technol* 30:609–615. doi: 10.1006/fstl.1997.0240
- Bonilla J, Sobral PJA (2016) Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Biosci* 16:17–25. doi: 10.1016/j.fbio.2016.07.003
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- British Standard Method (1998) BS 684-2.24-1998: Methods of analysis of fats and fatty oils. Other methods. Determination of anisidine value.
- Brody AL, Bugusu B, Han JH, et al (2008) Innovative food packaging solutions. *J Food Sci*. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x
- Brody AL, Strupinsky ER, Kline LR (2001) Active Packaging for Food Applications. In: CRC Press (ed) *Active Packaging for Food Applications*. pp 1–30
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M (2011) Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem* 127:1821–1827. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.071
- Cacho JI, Campillo N, Viñas P, Hernández-Córdoba M (2016) Determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography. *Food Chem* 200:249–54. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.026
- Calucci L, Pinzino C, Zandomenighi M, et al (2003) Effects of  $\gamma$ -irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *J Agric Food Chem* 51:927–934. doi: 10.1021/jf020739n

- Camo J, Beltrán JA, Roncalés P (2008) Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Sci* 80:1086–1091. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.04.031
- Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR (2015) Natural food additives: Quo vadis? *Trends Food Sci Technol* 45:284–295. doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.007
- Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione C (2009) Tabelle di composizione degli alimenti.  
[http://nut.entecra.it/646/tabelle\\_di\\_composizione\\_degli\\_alimenti.html?idalimento=06850&quant=100](http://nut.entecra.it/646/tabelle_di_composizione_degli_alimenti.html?idalimento=06850&quant=100). Acedido a 27 Sep 2016
- Chammem N, Saoudi S, Sifaoui I, et al (2015) Improvement of vegetable oils quality in frying conditions by adding rosemary extract. *Ind Crops Prod* 74:592–599. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.054
- Chan EWC, Kong LQ, Yee KY, et al (2012) Rosemary and Sage Outperformed Six other Culinary Herbs in Antioxidant and Antibacterial Properties. *Int J Biotechnol Wellness Ind* 1:142–151. doi: 10.6000/1927-3037/2012.01.02.06
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N (2005) Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem* 92:491–497. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.07.035
- Chen F, Wang C, Zhang M, et al (2014) Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection. *Talanta* 119:83–89. doi: 10.1016/j.talanta.2013.10.052
- Chen J, Cai D, Zhang Y (2016) Rapid determination of lipid peroxidation using a novel pyridoxamine-participating ferrous oxidation-sulfosalicylic acid spectrophotometric method. *Food Chem* 211:637–644. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.106
- Chua LS, Latiff NA, Mohamad M (2016) Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide enriched extract. *J Appl Res Med Aromat Plants* 3:64–70. doi: 10.1016/j.jarmap.2016.01.004
- Civille GV, Oftedal KN (2012) Sensory evaluation techniques — Make “good for you” taste “good.” *Physiol Behav* 107:598–605. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.04.015
- Coles R, McDowell D, Kirwan MJ (eds) (2003) *Food Packaging Technology*. Blackwell Publishing Ltd
- Comissão Europeia (2011) Regulamento (UE) N° 10/2011 da Comissão. *J Of da União Eur* L:1–89.
- Comissão Europeia (2004) Regulamento (CE) N° 1935/2004. *J Of da União Eur* 4–17.

- Comissão Europeia (2009) Regulamento (CE) N° 450/2009.
- Comissão Europeia (2010a) Directiva 2010/67/UE. J Of da União Eur L 277:17–26.
- Comissão Europeia (2010b) Directiva 2010/69/UE. J Of da União Eur 22–31.
- Costa D (2013) Embalagens activas com propriedades antioxidantes: desenvolvimento de um método analítico e avaliação da segurança alimentar. Universidade de Lisboa
- Costa DC, Costa HS, Albuquerque TG, et al (2015) Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. Trends Food Sci Technol 45:336–354. doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.009
- Cruz JM, Conde E, Domínguez H, Parajó JC (2007) Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. Food Chem 100:1059–1064. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.012
- Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC (2005) Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. Food Chem 90:503–511. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.05.018
- Cuvelier M-E, Richard H, Berset C (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J Am Oil Chem Soc 73:645–652. doi: 10.1007/BF02518121
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG (2000) GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J Agric Food Chem 48:2576–2581. doi: 10.1021/jf990835x
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules 15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313
- Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, et al (2008) Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. Trends Food Sci Technol 19:S103–S112. doi: 10.1016/j.tifs.2008.09.011
- de Wit JN (1998) Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. J Dairy Sci 81:597–608. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9
- Domínguez MRL (2008) Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos.
- Dvaranauskaitė A, Venskutonis PR, Raynaud C, et al (2009) Variations in the essential oil composition in buds of six blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars at various development phases. Food Chem 114:671–679. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.005
- Edris AE (2007) Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. Phyther Res 21:308–323. doi: 10.1002/ptr.2072
- Erdmann ME, Lautenschlaeger R, Zeeb B, et al (2016) Effect of Differently Sized O/W

- Emulsions Loaded with Rosemary Extract on Lipid Oxidation in cooked Emulsion-Type Sausages Rich in n-3 Fatty Acids. *LWT - Food Sci Technol*. doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.022
- Erdogrul OT (2002) Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in. *Pharm Biol* 40:269–273.
- Erkan N, Ayranci G, Ayranci E (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem* 110:76–82. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.058
- Fecka I, Turek S (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem* 108:1039–1053. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.035
- Ferrari CK b. (1998) Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Rev Nutr* 11:3–14. doi: 10.1590/S1415-52731998000100001
- Ferreira LE, Benincasa BI, Fachin AL, et al (2016) *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Parasitol* 228:70–76. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.08.011
- Food And Drug Administration (2016) Substances GRAS in food. In: 21 CFR 182. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5>. Acedido a 27 Jul 2016
- Frankel E (1996) Antioxidants in lipid food and their impact on food quality. *Food Chem* 57:51–55.
- Frankel EN (1980) Lipid oxidation. *Prog Lipid Res* 19:1–22. doi: 10.1016/0163-7827(80)90006-5
- Frankel EN (2005) Lipid oxidation. . *Oily Press lipid Libr* ; 18 19:1–22.
- French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety A (2013) Table Ciquial - Composition nutritionnelle des aliments. <https://pro.anses.fr/tableciquial/index.htm>. Acedido a 27 Sep 2016
- Frutos MJ, Hernández-Herrero JA (2005) Effects of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. *LWT - Food Sci Technol* 38:651–655. doi: 10.1016/j.lwt.2004.08.013
- Gavarić N, Kladar N, Mišan A, et al (2015) Postdistillation waste material of thyme (*Thymus*



- vulgaris* L., Lamiaceae) as a potential source of biologically active compounds. Ind Crops Prod 74:457–464. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.070
- Gómez-Estaca J, Montero P, Giménez B, Gómez-Guillén M (2007) Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). Food Chem 105:511–520. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.006
- González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, et al (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol 111:476–482. doi: 10.1016/j.jep.2006.12.011
- Gorton M, Barjolle D (2013) Theories of Food Choice. In: Food Consumer Science. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 15–26
- Gray JI (1978) Measurement of lipid oxidation: A review. J Am Oil Chem Soc 55:539–546. doi: 10.1007/BF02668066
- Guo Q, Gao S, Sun Y, et al (2016) Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. Ind Crops Prod 94:82–88. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.08.032
- Gutiérrez JB (2000) Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos
- Hernández-Hernández E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME, Guerrero Legarreta I (2009) Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*accos vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Sci 81:410–417. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.09.004
- Hernandez-Izquierdo VM, Krochta JM (2008) Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review. J Food Sci 73:R30–R39. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x
- Hill LE, Gomes C, Taylor TM (2013) Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. LWT - Food Sci Technol 51:86–93. doi: 10.1016/j.lwt.2012.11.011
- Ho C-T (1992) Phenolic Compounds in Food: An Overview. In: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. American Chemical Society, Washington DC, pp 2–7
- Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. Food Chem 126:339–346. doi:

- 10.1016/j.foodchem.2010.10.076
- Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP (2010) Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. Food Chem 123:85–91. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.003
- Hossain MB, Brunton NP, Barry-Ryan C, et al (2008) Antioxidant Activity of Spice Extracts and Phenolics in Comparison To Synthetic Antioxidants. Rasayan J Chem 1:751–756.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2016) Valor Nutricional do Salame. <https://insa.foodcase.ch/foodcomp/food?272>. Acedido a 27 Sep 2016
- Jacotet-Navarro M, Rombaut N, Fabiano-Tixier A-S, et al (2015) Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. Ultrason Sonochem 27:102–109. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.05.006
- Johnson JJ (2011) Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. Cancer Lett 305:1–7. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.005
- Kala CP (2015) Medicinal and aromatic plants: Boon for enterprise development. J Appl Res Med Aromat Plants 2:134–139. doi: 10.1016/j.jarmap.2015.05.002
- Kato S, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N (2009) Highly hydroxylated or  $\gamma$ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and  $\beta$ -carotene bleaching assay. Bioorg Med Chem Lett 19:5293–5296. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.149
- Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, et al (2005) Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chem 91:639–644. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.033
- Khanzadi M, Jafari SM, Mirzaei H, et al (2015) Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate-pullulan by application of beeswax. Carbohydr Polym 118:24–29. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.015
- Kowalczyk D, Baraniak B (2011) Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. J Food Eng 105:295–305. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.037
- Król B, Kiełtyka-Dadasiewicz A (2015) Yield and herb quality of thyme (*Thymus vulgaris* L.) depending on harvest time. Turk J F Crop 20:78–84.
- Kuskosk EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R (2006) Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. Ciência Rural 36:1283–1287.
- Lawless HT, Heymann H (2010) Sensory Evaluation of Food, Second Edi. Springer New York,

New York, NY

- Lee S-J, Umano K, Shibamoto T, Lee K-G (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 91:131–137. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.05.056
- Lo A-H, Liang Y-C, Lin-Shiau S-Y, et al (2002) Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- $\kappa$ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23:983–991. doi: 10.1093/carcin/23.6.983
- Logani MK, Davies RE (1980) Lipid oxidation: Biologic effects and antioxidants - a review. *Lipids* 15:485–495. doi: 10.1007/BF02534079
- Lopes A, Teixeira D, Calhau C, et al (2015) Ervas Aromáticas - uma Estratégia para a Redução do Sal na Alimentação dos Portugueses. In: Direção-Geral da Saúde D (ed) Programa Nacional para a Promoção de Alimentação Saudável.
- Lubbe A, Verpoorte R (2011) Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Ind Crops Prod* 34:785–801. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.01.019
- Madsen HL, Sørensen B, Skibsted LH, Bertelsen G (1998) The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chem* 63:173–180. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00038-7
- Márquez-Ruiz, G, García-Martínez MC, Holgado F (2008) Changes and Effects of Dietary Oxidized Lipids in the Gastrointestinal Tract. *Lipid Insights* 2:11–19.
- Marshall K (2004) Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev J Clin Ther* 9:136–156.
- McClements DJ, Decker EA (2000) Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *J Food Sci* 65:1270–1282. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x
- Mehta BM, Darji VB, Aparnathi KD (2015) Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. *Food Chem* 185:449–453. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.023
- Miller DD (1998) *Food chemistry: a laboratory manual*, 2nd edn. Wiley
- Miller HE (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 48:91–91. doi: 10.1007/BF02635693
- Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology M (2015) *Standard Tables of Food Composition in Japan*.
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov Aa (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res* 40:223–

231. doi: 10.1080/10715760500473834
- Moure A, Franco D, Sineiro J, et al (2001) Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Res Int* 34:103–109. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00136-8
- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, et al (2015) Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chem* 173:339–347. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.042
- Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, Kang RKL (2000) Biological Activity of Essential Oils and Their Constituents (Part B). In: Atta-ur-Rahman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V., pp 571–631
- Naveena BM, Vaithyanathan S, Muthukumar M, et al (2013) Relationship between the solubility, dosage and antioxidant capacity of carnolic acid in raw and cooked ground buffalo meat patties and chicken patties. *Meat Sci* 95:195–202. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.04.043
- Negi PS (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol* 156:7–17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006
- Ngarize S, Adams A, Howell N (2005) A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures. *Food Hydrocoll* 19:984–996. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.12.008
- Nissen LR, Byrne D V., Bertelsen G, Skibsted LH (2004) The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Sci* 68:485–495. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.05.004
- O'Connor T, O'Brien N (2006) Lipid Oxidation. In: Fox PF, McSweeney PLH (eds) *Advanced Dairy Chemistry*, 3rd edn. pp 557–558
- Oakes KD, Kraak GJ Van Der (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Food Res Int* 36:447–463. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00204-7
- Okpala COR, Bono G, Geraci ML, et al (2016) Lipid oxidation kinetics of ozone-processed shrimp during iced storage using peroxide value measurements. *Food Biosci* 16:5–10. doi: 10.1016/j.fbio.2016.07.005
- Organização Mundial de Saúde O (2015) Food safety. In: Fact sheet N°399. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>. Acedido a 24 Aug 2016
- Osawa CC, Eduardo P, Felício D, et al (2005) Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Quim Nova* 28:655–663. doi:

10.1590/S0100-40422005000400019

- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 18:414–420. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.11.009
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2006) Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. Meat Sci 73:236–244. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.11.019
- Özcan M, Chalchat J (2004) Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. Bulg J Plant Physiol 30:68–73.
- Ozdikicierler O, Dirim SN, Pazir F (2014) The effects of spray drying process parameters on the characteristic process indices and rheological powder properties of microencapsulated plant (*Gypsophila*) extract powder. Powder Technol 253:474–480. doi: 10.1016/j.powtec.2013.12.004
- Pavela R (2015) Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Ind Crops Prod 76:174–187. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.050
- Pelegri DH, Gasparetto CA (2003) Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. Rev Bras Prod Agroindustriais, Camp Gd 5:57–65.
- Pereira de Abreu DA, Losada PP, Maroto J, Cruz JM (2010) Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Food Res Int 43:1277–1282. doi: 10.1016/j.foodres.2010.03.019
- Perez-Gago MB, Krochta JM (2000) Drying Temperature Effect on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Whey Protein–Lipid Emulsion Films. J Agric Food Chem 48:2687–2692. doi: 10.1021/jf0001583
- Phan-Thi H, Durand P, Prost M, et al (2016) Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activities of  $\beta$ -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells. Food Chem 190:1137–1144. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.088
- Piccaglia R, Marotti M, Giovanelli E, et al (1993) Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. Ind Crops Prod 2:47–50. doi: 10.1016/0926-6690(93)90010-7
- Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas G-JE, Komaitis M (2005) RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. J Agric Food Chem 53:1190–1195. doi: 10.1021/jf040083t
- Proestos C, Sereli D, Komaitis M (2006) Determination of phenolic compounds in aromatic

- plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chem 95:44–52. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.12.016
- Ramos OL, Pereira RN, Rodrigues R, et al (2014) Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. Food Res Int 66:344–355. doi: 10.1016/j.foodres.2014.09.036
- Rates SM. (2001) Plants as source of drugs. Toxicon 39:603–613. doi: 10.1016/S0041-0101(00)00154-9
- Reis AR dos S (2014) Estudo de compostos bioactivos e vitaminas de plantas aromáticas e sua aplicação em embalagens alimentares activas. Universidade de Lisboa
- Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, et al (2015) A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Trends Food Sci Technol 45:355–368. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.015
- Robards K (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. J Chromatogr A 1000:657–691. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00058-X
- Romano CS, Abadi K, Repetto V, et al (2009) Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chem 115:456–461. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.029
- Ross CF, Smith DM (2006) Use of Volatiles as Indicators of Lipid Oxidation in Muscle Foods. Compr Rev Food Sci Food Saf 5:18–25. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00077.x
- Rozman T, Jersek B (2009) Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of Listeria. Acta Agric Slov 93:51–58. doi: 10.2478/v10014-009-0007-z
- Samotyja U, Małecka M (2007) Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. Food Chem 104:317–323. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.046
- Sanches Silva A, Cruz Freire JM, Franz R, Paseiro Losada P (2008) Time-temperature study of the kinetics of migration of diphenylbutadiene from polyethylene films into aqueous foodstuffs. Food Res Int 41:138–144. doi: 10.1016/j.foodres.2007.10.007
- Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TG, et al (2014) Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. Food Addit Contam Part A 31:374–395. doi: 10.1080/19440049.2013.879215
- Sanches-Silva A, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004) Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 1046:75–81. doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.101

- Sánchez-Moreno C, Larrauri J a., Saura-Calixto F (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270–276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, et al (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol* 35:275–280. doi: 10.1590/S1517-83822004000300001
- Shahidi F, Wanasundara UN (2008) Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. In: Akoh CC, Min DB (eds) *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3rd edn. CRC Press, pp 387–403
- Shahidi F, Zhong Y (2005) Lipid Oxidation: Measurement Methods. In: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA,
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H (2005) Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J Agric Food Chem* 53:7749–7759. doi: 10.1021/jf051513y
- Spáčil Z, Nováková L, Solich P (2008) Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta* 76:189–199. doi: 10.1016/j.talanta.2008.02.021
- Teixeira LV (2009) Análise Sensorial Na Indústria De Alimentos. *Rev do Inst Laticínios Cândido Tostes* 64:12–21.
- Thøgersen J (1996) Wasteful food consumption: Trends in food and packaging waste. *Scand J Manag* 12:291–304. doi: 10.1016/0956-5221(96)00011-5
- United States Department of Agriculture (2016) National Nutrient Database for Standard Reference.  
<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/1725?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=salami&ds=>. Acedido a 27 Sep 2016
- Veloso MC da C, Silva VM da, Santos GV, Andrade JB (2001) Determination of Aldehydes in Fish by High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr Sci* 39:173–176.
- Wang H, Provan GJ, Helliwell K (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem* 87:307–311. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.12.029
- Waszkowiak K, Dolata W (2007) The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. *Meat Sci* 75:178–183. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.01.004
- Wen J, Morrissey P, Walton J, Sheehy P (1997) Rapid and Quantitative Determination of

- Hexanal in Cooked Muscle Foods. *Irish J Agric Food Res* 36:75–84.
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105:940–949. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038
- Xu H, Lv L, Hu S, Song D (2010) High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization. *J Chromatogr A* 1217:2371–2375. doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.068
- Yucel U (2016) Intelligent Packaging. In: Reference Module in Food Science. Elsevier,
- Zeng X, Ruan D, Koehl L (2008) Intelligent sensory evaluation: Concepts, implementations, and applications. *Math Comput Simul* 77:443–452. doi: 10.1016/j.matcom.2007.11.013
- Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165–5170. doi: 10.1021/jf010697n





## Anexos

### Anexo I – Questionário da Análise Sensorial



#### Análise Sensorial

No âmbito da minha Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, estou a desenvolver embalagens alimentares à base de proteína de soro de leite incorporadas com alecrim. Para testar as embalagens utilizo o Salame por ser um alimento com alto teor lipídico. Para analisar de forma completa as minhas embalagens, vou realizar uma análise sensorial do produto em que gostaria de ter a sua participação. As provas serão realizadas na Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril (ESHTE) conforme a disponibilidade da maior parte das pessoas que responderem a este inquérito. Obrigada!

\*Obrigatório

Nome \*

(Necessito saber o seu nome para o poder contactar)

A sua resposta

Email \*

(Necessito saber o seu email para o poder contactar)

A sua resposta

**Idade \***

- ☐ Entre 18 e 25 anos.
- ☐ Entre 26 e 35 anos.
- ☐ Entre 36 e 45 anos.
- ☐ Entre 46 e 65 anos.
- ☐ Maior que 65 anos.

**Sexo \***

- ☐ Feminino
- ☐ Masculino

SEGUINTE

**Está grávida? \***

- ☐ Sim.
- ☐ Não.

ANTERIOR

SEGUINTE

Nacionalidade \*

☐ Portuguesa

☐ Outra:

Nível de escolaridade. \*

☐ Ensino básico (1º e 2º Ciclo)

☐ Ensino secundário

☐ Licenciatura

☐ Mestrado

☐ Doutoramento

Tem alguma alergia alimentar? \*

☐ Não

☐ Sim, a salame.

☐ Sim, a plantas aromáticas

☐ Outra: \_\_\_\_\_

É fumador/a? \*

☐ Não.

☐ Fumo quando saio à noite.

☐ 2-3 cigarros por dia.

☐ Entre 4 a 10 cigarros por dia.

☐ Entre 11 a 20 cigarros por dia.

☐ Mais de 20 por dia.

---

Quantas vezes consome café? \*

- ☐ Não consumo.
- ☐ Algumas vezes durante a semana.
- ☐ 1 a 2 por dia.
- ☐ 3 a 4 por dia.
- ☐ Mais do que 5 por dia.

Quantas vezes consome chá preto? \*

- ☐ Não consumo.
- ☐ Algumas vezes durante a semana.
- ☐ 1 a 2 vezes por dia.
- ☐ 3 a 4 vezes por dia.
- ☐ Mais do que 5 vezes por dia.

O seu estado actual de saúde é (assinale a opção que corresponde à sua situação atual): \*

- ☐ Não tenho problemas de saúde.
- ☐ Constipado/a ou engripado/a.
- ☐ Problemas crónicos ao nível dos órgãos sensoriais (olhos, boca (língua, dentes, gengivas), mãos, nariz ou ouvidos).
- ☐ Alergias crónicas.
- ☐ Outra: \_\_\_\_\_

Possui algum nível de daltonismo? \*

- ☐ Não
- ☐ Sim
- ☐ Outra:

Qual o seu interesse em fazer parte de um painel de provadores de salame? \*

- ☐ Tenho muito interesse e quero fazer parte do painel treinado.
- ☐ Tenho muito interesse, mas não quero ser treinado.
- ☐ Não tenho interesse.

Em relação à comunicação verbal: \*

- ☐ Tenho facilidade em comunicar e bom vocabulário.
- ☐ Tenho alguma facilidade em comunicar.
- ☐ Sou tímido/a e não gosto de falar em público.

Qual a sua opinião em relação ao salame? \*

- ☐ Gosto muito.
- ☐ Gosto.
- ☐ É-me indiferente.
- ☐ Não gosto.
- ☐ Detesto.
- ☐ Nunca experimentei.

Com que frequência consome salame? \*

- ☐ Todos os dias.
- ☐ Pelo menos uma vez por semana.
- ☐ De vez em quando.
- ☐ Pelo menos uma vez por mês.
- ☐ Nunca comi.

Fez parte de algum painel de avaliação sensorial ou participou em alguma prova sensorial? \*

- ☐ Sim, já classifiquei se gostava/não gostava.
- ☐ Sim, fui treinado e já identifiquei uma amostra diferente das outras.
- ☐ Sim, fui treinado e já descrevi uma amostra (textura, aparência, sabor).
- ☐ Sim, já classifiquei uma amostra diferente das outras, mas não fui treinado.
- ☐ Sim, já descrevi uma amostra (textura, aparência, sabor), mas não fui treinado.
- ☐ Nunca fiz parte de uma análise sensorial.

### Disponibilidade

Serão realizadas 3 provas de salame na ESHTe (Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril). É obrigatório comparecer às três.

	11h00	17h00	18h00	19h00
23, 24 e 31 de Maio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
30 e 31 de Maio e 7 de Junho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

ANTERIOR

SUBMITER

Nunca envia palavras-passe através dos Formulários do Google.

## **Anexo II – Comunicações Internacionais/Nacionais sob a forma de *Poster***

**M. Andrade**, M. M. Guerra, A. Sanches-Silva. Sensory characterization of salami packaged in a biodegradable film incorporated with rosemary extract. International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging (InSIPack), Lisbon, Portugal. June 2016.

**M. Andrade**, R. Ribeiro-Santos, N. Ramos de Melo, A. Sanches-Silva. Evaluation of combined or single use of aromatic plants extracts in whey protein films. International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging (InSIPack), Lisbon, Portugal. June 2016

**M. Andrade**, R. Ribeiro-Santos, N. Ramos de Melo, A. Sanches-Silva. Whey protein films with aromatic plants extracts: optimization of the casting process. International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging (InSIPack), Lisbon, Portugal. June 2016

**M. Andrade**, C. Maia, C. Belo Correia, M. Saraiva, A. Sanches-Silva. Antimicrobial activity of active whey protein films. International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging (InSIPack), Lisbon, Portugal. June 2016.

**M. Andrade**, R. Ribeiro-Santos, N. Ramos de Melo, A. Sanches-Silva. Effectiveness of an active whey protein film against lipid oxidation. International Conference on Safety and Innovation in Food Packaging (InSIPack), Lisbon, Portugal. June 2016.

**M. Andrade**, A. Sanches-Silva. Monitorização do hexanal num alimento modelo para avaliação da eficácia de uma embalagem ativa antioxidante à base de proteína de soro de leite. 9ª Resunião Anual PortFIR – Informação alimentar: desafios e conquistas, Lisboa, Portugal. Outubro 2016.



## **Anexo III – Comunicações Internacionais/Nacionais sob a forma de *Poster* - Abstracts**

### **Sensory characterization of salami packaged in a biodegradable film incorporated with rosemary extract**

**Mariana Andrade**<sup>1,2</sup>; Manuela M. Guerra<sup>3</sup>; Ana Sanches-Silva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal;

<sup>3</sup> Estoril Higher Institute for Tourism and Hotel Studies (ESHTE), Av. Condes de Barcelona, n.º 808  
2769-510 Estoril, Portugal

<sup>4</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

In today's world, food packaging is present in our day-to-day and it is a common habit to acquire packaged food. The function of packaging is to protect food from external factors such as humidity, temperature and light, inform consumers about the nutritional value of the food it contains and protect from internal factors, responsible for food degradation. The lipid oxidation is one of the factors that originates food degradation and represents a danger to public health, since it can originate irreversible food changes and leave food unfit for consumption. Active food packaging appears to offer a solution for this problem. Natural antioxidants from aromatic plants may be incorporated into active packaging to inhibit lipid oxidation and to extend the food shelf life.

A whey protein based active film incorporated with a rosemary extract was developed for packing fatty foods, in order to stop or inhibit lipid oxidation, increasing products' shelf life. The studied product was salami slices packaged with the whey protein based film incorporated with a rosemary extract for two periods of time: 30 days and 90 days (stored at 5 °C, protected from light). A control sample was included consisting on salami slices packaged with the whey protein based film without rosemary extract for the same time periods.

Descriptive sensory analysis was used for Salami characterization using a trained panel constituted by 12 individuals. An on line questionnaire was previously performed to former Culinary Arts students, Chefs and general consumers. Questions included socio-demographic data and requisites for participating in the panels. Requisites for the trained panel were: not being sick or having a chronic disease that could affect sensory perception, not being pregnant, interest in performing the tests, availability and liking the analyzed product. Unpacked commercially available salami was used for training the panel and for descriptors generation. The panel evaluated the samples with a 1-5 descriptive scale for the following descriptors: regarding the taste salty, smoky, foreign, acidity, bitterness, spicy and

spices; regarding the texture greasy, fibrous, juicy and softness; regarding other parameters red color, typical smell, typical aroma and an appetitive appearance.

The panel found the unpacked sample salty, with a smoky flavor, a little acid and bitter. Regarding the texture, the panel found the salami with a greasy, fibrous, soft and juicy texture. The panel also found that the product is reddish, with a typical smell and aroma, and an appetitive aspect. In the second session the panel evaluated the salami packaged with the active film. Regarding the salami slices packaged with the whey protein film incorporated with the rosemary extract, the panel found the salami less salty than the original sample and with low smoky flavour and that the salami is a little acid and bitter.

**Keywords:** sensory analysis, salami, rosemary extract, active films.

---

### Evaluation of the Potential Use of Aromatic Plants Extract in Food Packaging

**Mariana Andrade**<sup>1,2</sup>; Regiane Ribeiro-Santos<sup>1,3</sup>; Nathália R. Melo<sup>3,4</sup>; Ana Sanches-Silva<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal;

<sup>3</sup> Department of Food Technology, Institute of Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil;

<sup>4</sup> Department of Agribusiness Engineering, Federal Fluminense University – Volta Redonda, RJ – Brazil;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Food packaging it's made to ensure that external factors, like temperature or light, don't affect the quality of the food inside. The conventional packaging aim is to protect the food from external factors, but it can't protect the food from itself. In order to protect the food from itself, the food industry applies antioxidants witch, most of them, are synthetic. Recent studies have showed that these synthetic antioxidants can be harmful for human health and have been associated with allergic reactions [1]. Due to the adverse effects of synthetic antioxidants, the food industry is trying to substitute these by natural antioxidants. The objective of these work was to evaluate and compare the antioxidant potential of the extracts of rosemary (*Rosemary officinalis* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and mixtures of both. In order to do so, DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay and β-carotene bleaching assay were applied.

The DPPH• assay was described by Moure *et al.* (2001) and the β-carotene bleaching assay was described by Miller (1971). The Percent Inhibition (PI) and the Antioxidant Activity Coefficient (AAC) were calculated.

Based on the results of both assays and the yield of each extract, we chose the rosemary of brand 3 and the thyme of brand 3 to make the mixtures to compare the results. By comparison of the results of the chosen extracts and the mixtures we can conclude that

although the Mix 3 presents a greater antioxidant activity by DPPH• assay, the same is not true in the  $\beta$ -carotene assay, which shows that the Rosemary Brand 3 has a better antioxidant capacity.

Since the results of both tests were not equivalent, we conclude that Rosemary of Brand 3 had the best performance comparing the antioxidant capacity and yield. We can add that in both assays he had a similar behaviour in antioxidant activity.

#### References:

- [1] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba. Food Chem. 200 (2016) 249–54. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.026.
- [2] A. Moure, D. Franco, J. Sineiro, H. Domínguez, M.J. Núñez, J.M. Lema. Food Res. Int. 34 (2001) 103–109. doi:10.1016/S0963-9969(00)00136-8.
- [3] H.E. Miller. J. Am. Oil Chem. Soc. 48 (1971) 91. doi:10.1007/BF02635693.

---

### **Whey protein films with aromatic plants extracts: optimization of the casting process**

**Mariana Andrade<sup>1,2</sup>; Regiane Ribeiro-Santos<sup>1,3</sup>; Nathália R. Melo<sup>3,4</sup>; Ana Sanches-Silva<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal;

<sup>3</sup> Department of Food Technology, Institute of Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil;

<sup>4</sup> Department of Agribusiness Engineering, Federal Fluminense University– Volta Redonda, RJ – Brazil;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

A food package is a system that provides a safe and easy handling during transportation, distribution and storage, from the food processing until it reaches the consumer [1]. The demand of consumers for foods with extended shelf-life and higher quality, has encouraged food industry to develop new technologies to deliver foods with improved quality and safety and healthier. In line with this, active and intelligent packaging have emerged. According to the European Commission, an active material is “intended to extend the shelf-life or to maintain or improve the condition of packaged food” and they are “designed to deliberately incorporate components that would release or absorb substances into or from the packaged food or the environment surrounding the food” [2]. A film based on whey protein is biodegradable and presents very interesting technological properties such as good mechanical resistance and good gas barrier in a low humidity ambient [3]. The goal of this work was to optimize the casting process of a whey protein film that incorporates plant extracts. This film is intended to prevent lipid oxidation of fatty food.

Films were prepared by solvent casting and they were composed by whey protein, water, glycerol and plant extracts. First, different amounts of glycerol were tested (5-15%,

w/w) and then, different amounts of plant extracts (1- 5%, w/w) were assayed. Different drying conditions (temperature and time) were also evaluated.

Results revealed that 5 and 10% (w/w) of glycerol, allowed obtaining the best results. In this case, films presented good appearance and flexibility. In what concerns to the amount of plant extract, the film with 1% of plant extract gave better results because it allowed obtaining films that were easily 1% (w/w) removed from the surface and they presented homogeneous appearance.

The aim of the study, i.e. the addition of whey protein films with plant extracts, was successfully achieved. The optimized addition method can be considered appropriate for preparing a suitable active system in any routine analytical laboratory, thereby avoiding the need for specific equipment like an extruder. Further studies will be required in order to check for the efficiency of this new active film in the inhibition of lipid oxidation of fatty foods.

#### Acknowledgements

This work was supported by the research project "Development of an edible film based on whey protein with antioxidant and antimicrobial activity using essential oils" (2012DAN807) funded by the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, I.P. (Lisbon, Portugal). Regiane Ribeiro dos Santos (BEX 8754/14-4) is grateful for her research grant funded by Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) and Department of Food Technology, Institute of Technology, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

#### References

- [1] M. de F. Poças and R. Moreira, *Segurança Alimentar e Embalagem*. 2003.
- [2] European Commission, "Regulation (EC) No. 450/2009," *Off. J. Eur. Union* L135 (2009) 3–11.
- [3] S. Galus and J. Kadzińska. *Food Hydrocoll.*, 52 (2015) 78–86.

---

### Antimicrobial activity of active whey protein films

**Mariana Andrade**<sup>1,2</sup>, Carla Maia<sup>1</sup>, Cristina Belo Correia<sup>1</sup>, Ana Sanches-Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Aromatic plants are well known for their antioxidant and antimicrobial properties. The content of essential oils and extracts of these plants on compounds responsible for these properties, such as phenolic compounds, depend on different factors, including the variety of the plant, plant part, edaphoclimatic conditions, drying conditions (if applicable) and methods of extraction and analysis [1, 2].

The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of a whey protein film incorporated with an aromatic plant extract intended for food applications. The antimicrobial activity was evaluated against yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*).

To test the antimicrobial activity of the film, a suspension of each microorganism was inoculated on the surface of agar media plates. Then, flat squares from the whey protein film with (active test films) and without (control films) the aromatic plant extract were placed on the agar surface. The Petri dishes containing the agar media inoculated and a square film were then incubated under temperature and time conditions according to the target microorganism.

Finally, the zone of inhibition of microbial growth on and around the test films was evaluated and compared with the negative control.

The results obtained revealed that the active whey protein films have antibacterial activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *C. perfringens*, suggesting that the new edible food packaging based on whey protein tested in the present work has great potential to be used by food industry with the aim of inhibiting microorganisms commonly responsible for food spoilage/food-borne diseases.

#### References

- [1] M. Kozłowska, A.E. Laudy, J.L. Przybył, M. Ziarno, E. Majewska, Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 72 (2015) 757–767.
- [2] R. Ribeiro-Santos, D. Carvalho-Costa, C. Cavaleiro, H. S. Costa, T. Gonçalves Albuquerque, M. C. Castilho, F. Ramos, N. R. Melo, A. Sanches-Silva. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology* (2015), 45: 355-368.

#### Acknowledgements

This work was supported by the research project “Development of an edible film based on whey protein with antioxidant and antimicrobial activity using essential oils” (2012DAN807) funded by the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, I.P. (INSA, Portugal).

## Evaluation of a biodegradable food package incorporated with rosemary extract

Mariana Andrade<sup>1,2</sup>; Regiane Ribeiro-Santos<sup>1,3</sup>; Nathália R. Melo<sup>3,4</sup>; Ana Sanches-Silva<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal;

<sup>3</sup> Department of Food Technology, Institute of Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil;

<sup>4</sup> Department of Agribusiness Engineering, Federal Fluminense University– Volta Redonda, RJ – Brazil;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Active packaging is an emerging resource used by the food industry to protect and prolong the shelf-life of foods. This package is characterized by having a desirable migration from the package to the food inside, protecting the food from natural degradation factors, like lipid oxidation. Lipid oxidation is a natural chemical reaction and one of the main causes of quality degradation in foods, especially the fatty ones. This reaction can alter the organoleptic properties of foods, leading to the formation of unpleasant flavors and/or odors and potential toxic compounds. Lipid oxidation also changes the nutritional value and reduces the shelf-life of products [1].

Aromatic plants are known since ancient times for their biological properties which include antioxidant activity. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is one of those plants with a higher antioxidant activity than the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA), trolox and ascorbic acid [2]. Its extract and essential oil has been recognized as GRAS (Generally Recognized as Safe) for their intended use by the Food and Drugs Administration (FDA) [3] and by the European Commission [4,5].

A whey protein based film was incorporated with rosemary extract and salami slices were packaged for five (7, 15, 30, 60 and 90 days) different time periods. A whey protein based film without the rosemary extract was used as a control. To evaluate the efficacy of the whey protein based film against lipid oxidation, the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay used was based in the assay described by Miller (1998). This assay measures the malondialdehyde (MDA) content, which is a marker for the oxidative stress of foods.

The results showed that the salami slices packaged with the film with the rosemary extract had a lower MDA (mg/kg) content than the salami dishes packaged with the control film, with the exception of the salami stored for 30 days. This result showed that the rosemary extract has some anti-oxidative effect against lipid oxidation inhibiting the MDA production.

References

- [1] D.J. McClements, E.A. Decker. *J. Food Sci.* 65 (2000) 1270–1282.
- [2] R. Ribeiro-Santos, D. Carvalho-Costa, C. Cavaleiro, H.S. Costa, T.G. Albuquerque, M.C. Castilho *et al.* *Trends Food Sci. Technol.* 45 (2015) 355–368.
- [3] Food And Drug Administration (FDA), Substances Generally Recognized as Safe, Code Fed. Regul. 3 (2015).
- [4] Commission Directive 2010/67/EU from European Parliament and European Food Safety Authority. *Off. J. Eur. Union.* (2010) 17–26.
- [5] Commission Directive 2010/69/EU from European Parliament and European Food Safety Authority. *Off. J. Eur. Union.* (2010) 22–31.
- [6] D.D. Miller, *Food Chemistry: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Wiley, 1998.

---

### **Monitorização do hexanal num alimento modelo para avaliação da eficácia de uma embalagem ativa antioxidante à base de proteína de soro de leite**

**Mariana Andrade**<sup>1,2</sup>; Ana Sanches-Silva<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, I.P., Lisbon, Portugal;

<sup>2</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisbon, Portugal;

<sup>3</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

As embalagens alimentares convencionais surgiram para proteger os alimentos de fatores externos, tais como os microrganismos e as diferenças de temperatura, mas são apenas barreiras desenhadas para retardar os efeitos adversos do meio em que o alimento está inserido. Na área das embalagens alimentares, têm surgido novos conceitos, tais como as embalagens ativas e inteligentes. As embalagens ativas, interagem deliberadamente com a matriz alimentar, absorvendo ou libertando substâncias do/para o alimento ou da/para a atmosfera interna da embalagem. O objetivo é aumentar a vida útil dos alimentos, por inibição de reações que podem causar a sua deterioração tal como a oxidação lipídica. A oxidação lipídica é um processo químico natural, ocorrendo principalmente em alimentos com alto teor lipídico sendo responsável pela degradação dos alimentos. Para a evitar, a indústria alimentar recorre a antioxidantes, na sua grande maioria sintéticos. Devido à sua comprovada capacidade antioxidante, as plantas aromáticas, tais como o alecrim e o tomilho, têm sido propostas como conservantes alimentares. O extrato de alecrim, foi autorizado como aditivo alimentar pela Comissão Europeia (Diretivas 2010/67/EU e 2010/69/EU). O objetivo deste trabalho foi a avaliação da eficácia de uma embalagem ativa à base de proteína de soro de leite e que incorpora um extrato de planta aromática, através da monitorização dos níveis de hexanal do alimento embalado ao longo de diferentes períodos de armazenamento. O hexanal é um aldeído formado no processo de oxidação dos ácidos gordos presentes na gordura e está relacionado com a degradação das propriedades

organoléticas dos alimentos. Foram embaladas fatias de salame com a embalagem ativa (como extrato de planta aromática) e com a embalagem controlo (sem o extrato ativo) por diferentes períodos de tempo. Para a determinação do estado da oxidação lipídica da amostra, recorreu-se ao método de Wen et al. (1997) para a extração do hexanal da amostra e ao método de Sanches-Silva et al. (2004), com modificações, para a identificação e quantificação do hexanal. Com exceção das fatias de salame expostas aos filmes por 30 dias, as fatias embaladas com o filme ativo mostraram um valor de hexanal inferior às fatias embaladas pelo filme controlo. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados encontrados na literatura, em embalagens alimentares ativas com extratos de plantas aromáticas.